



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ESTÁGIO SUPERVISIONADO II (QMC 5512)



**Preparação e bio-hidrogenação de Chalconas derivadas do
Piperonal utilizando *Saccharomyces cerevisiae***

Flávia Luiza de Souza Mundstock

Orientadora: Prof^ª Dr^a Maria da Graça Nascimento

Co-orientadora: Vanessa Dutra Silva

Florianópolis, novembro de 2008.

Laboratório de Biocatálise

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS – CFM
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Flávia Luiza de Souza Mundstock

Preparação e bio-hidrogenação de Chalconas derivadas do Piperonal
utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química, sob orientação de **Maria da Graça Nascimento**, Dra.Sc., e co-orientação da mestrandia **Vanessa Dutra Silva**.

Florianópolis, novembro de 2008.

Laboratório de Biocatálise

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS – CFM
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FLÁVIA LUIZA DE SOUZA MUNDSTOCK

Preparação e bio-hidrogenação de Chalconas derivadas do Piperonal
utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

Este Trabalho de graduação foi julgado adequado para a obtenção do título de Bacharel em Química e aprovado em sua forma final Pela Comissão examinadora e pelo Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^ª. Inês Maria da C. Brighente, Dr.Sc.
Coordenadora de Estágios

Comissão examinadora

Prof^ª. Maria da Graça Nascimento, Dr.Sc.
QMC/UFSC Orientadora

Prof^ª. Inês Maria da C. Brighente, Dr.Sc.
QMC/UFSC

Prof. Faruk José N. Aguilera, Dr.Sc.
QMC/UFSC

Ficha Catalográfica

Mundstock, Flávia Luiza de S., 1985-

Preparação e bio-hidrogenação de Chalconas derivadas do Piperonal utilizando *Saccharomyces cerevisiae* / Flávia Luiza de S. Mundstock. – 2008.

78 f. : il. color. ; 30 cm

Orientadoras: I. Maria da Graças Nascimento. II. Vanessa Dutra Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Química, 2008.

1. Chalconas. 2. Bio-hidrogenação. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Sistema Bifásico. I. Nascimento, Maria da Graça. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Química. III. Título.

Ao meu padrinho, Odair
(*in memoriam*),
quem desde o início
orientou meus passos.

AGRADECIMENTOS

Algumas vezes é difícil exprimir em palavras, aquilo que sentimos no coração. Hoje, ao fim desta jornada, vejo como é importante termos mãos amigas para nos sustentar. Não será fácil lembrar todos que me auxiliaram, mas farei o possível para incluir aqueles que marcaram minha estrada.

Acima de tudo, agradeço a Deus, por jamais me esquecer;

Aos meus pais, que abriram mão de muitos sonhos para realizar os nossos;

À minha irmã, Cássia, por estar sempre pronta para me ajudar;

Aos meus padrinhos, Ester e Odair (*in memoriam*), que sempre apoiaram meus projetos, tenho certeza de que, onde estiver, ele estará olhando por mim;

À minha “profe”, Maria da Graça Nascimento, pela amizade, paciência, orientação e incentivo neste e outros projetos;

À mestrandia Vanessa Dutra Silva, pela co-orientação e dedicação a este trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Biocatálise, André, Cris, Damianni, Geovanni, Isa, Marcelo, Nessa, Simone, Thiago e Zana, pelas conversas sobre química e os cafezinhos;

Às minhas amigas, Fabi, Isa e Mi, por todas as alegrias e paciência para ouvir minhas lamentações;

Ao meu namorado Cyro, que esteve ao meu lado durante todos os anos de faculdade, Deus dá as dicas, nós é que trilhamos nossos caminhos.

A UFSC, CNPq e CAPES pelo espaço e auxílio financeiro ao projeto.

RESUMO

A área multidisciplinar de biocatálise encontra-se atualmente em ascensão nas áreas de pesquisa e tecnologia. Tendo em vista a necessidade mundial do surgimento de métodos ambientalmente corretos, com menos poluição e menor agressão à atmosfera, o uso de catalisadores mais brandos e menos poluentes se faz muito útil.

Dentre os biocatalisadores mais comuns estão as leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, ou fermento de pão (**FP**). Isto se deve ao seu baixo custo relativo, ampla disponibilidade e não requerer conhecimentos aprofundados sobre o microorganismo, além de sua alta capacidade catalítica e de atuar em condições brandas. O **FP** tem se mostrado muito eficiente na hidrogenação enantiosseletiva de cetonas pró-quirais e de ligações do tipo C=C.

Neste trabalho foi sintetizada uma série de chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído e da acetofenona, substituída ou não (**27-34**), pelo método de condensação aldólica catalisada por base, estes substratos foram utilizados nas reações de bio-hidrogenação mediadas por fermento de pão em sistema bifásico.

As chalconas **27-34** foram obtidas a partir de reações simples e com rendimentos relativamente altos, 83,2-94,5 %, e foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas de RMN-¹H, IV e pelo ponto de fusão, comprovando a pureza dos produtos.

Ainda foi realizada a redução de **27-34** com o redutor hidreto metálico NaBH₄ aos correspondentes alcoóis quirais **35-42**, para comparação com o produto obtido de bio-hidrogenação.

Visando encontrar as melhores condições de atuação do fermento de pão em reações de BH de chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído em sistema bifásico, avaliaram-se as influências do tempo (c = 33-99%), temperatura (c = 58-68%), solvente orgânico (c = 0-67%), pH da fase aquosa (c = 55-99%), massa de biocatalisador (c = 73-99%), influência de grupos substituintes doadores ou retiradores de elétrons no anel aromático provindo da acetofenona (c = 14-64%) e, ainda, imobilização do fermento de pão em diferentes suportes (c = 0-47%).

Está bem documentado na literatura que as *S. cerevisiae* produzem enzimas altamente enantio e quimiosseletivas, e isto pode ser verificado neste trabalho, pois em todos os estudos houve redução exclusiva das ligações C=C α,β à carbonila, formando os produtos **59-66**, sendo uma alternativa viável para obtenção de cetonas saturadas, pois foram utilizadas condições reacionais brandas, custo relativamente baixo e um método menos poluente para o meio ambiente.

Palavras chave: chalconas, bio-hidrogenação, *Saccharomyces cerevisiae*, sistema bifásico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Redução da (<i>E</i>)-3-etil-4-(3-piridil)-3-buten-2-ona (1) utilizando FP	5
Figura 2. Redução de aldeídos e cetonas utilizando suco de cana de açúcar. (Adaptada da referência 15).....	6
Figura 3. Métodos de imobilização de biocatalisadores (adaptada da referência 9).....	8
Figura 4. Produtos obtidos pela redução do cinamaldeído com diferentes sistemas.....	9
Figura 5. Redução de ceto ésteres (adaptada da referência 32).....	10
Figura 6. Preparação das chalconas 27-34 derivadas do piperonal.....	14
Figura 7. Preparação dos alcoóis racêmicos derivados das chalconas 27-34	17
Figura 8. Imobilização do FP em diferentes suportes poliméricos.....	18
Figura 9. Imobilização do FP em montmorilonita K-10.....	19
Figura 10. Imobilização do FP em gel de Agar e gelatina.....	20
Figura 11. Mecanismo geral de formação das chalconas 27-34	22
Figura 12. Espectro de RMN- ¹ H da chalcona 27 em CDCl ₃ . (400 MHz).....	24
Figura 13. Espectro de infravermelho da chalcona 27 . (KBr).....	24
Figura 14. BH das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído.....	26
Figura 15. Espectro de RMN- ¹ H do produto da reação de BH de 27 , catalisada por FP , em CDCl ₃ . (400 MHz).....	27
Figura 16. Sobreposição dos cromatogramas da chalcona 27 (a), do álcool racêmico 35 (b) e o produto da reação de BH 59 (c), catalisada por FP . [condições operacionais: inj. = 250°C, Det. = 275°C, Ti = 100°C, Tfl = 150°C, Tf2 = 200°C, Δaq.1 = 10°C/min, Δaq.2 = 5°C/min, pH2 = 75kPa].....	28
Figura 17. Reação de BH biocatalisada por FP , em SB	28
Figura 18. Espectro de RMN- ¹ H de uma alíquota da reação de BH da chalcona 27 catalisada por FP . Em destaque a ampliação das regiões de interesse, CDCl ₃ . (400 MHz).....	29
Figura 19. Influência do tempo de reação de BH de 27 . [252,1 mg (1 mmol) do substrato, 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K ₂ HPO ₄ (0,1 M/0,2 M, pH 4,5); 6 g FP , 30°C].....	30
Figura 20. Influência da temperatura reacional da BH de 27 . [252,1 mg (1 mmol) do substrato; 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K ₂ HPO ₄ (0,1 M/0,2 M, pH 4,5); 6 g de FP ; 4 h.].....	31

Laboratório de Biocatálise

Figura 21. Influência do pH no SB de reação de BH de 27 . [252,1 mg (1 mmol) do substrato; 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K ₂ HPO ₄ (0,1 M/0,2 M, pH 3,5-8,8); 6 g de FP ; 35 °C; 4 h.].....	33
Figura 22. Influência da massa de biocatalisador. [252,1 mg (1 mmol) do substrato; 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K ₂ HPO ₄ (0,1 M/0,2 M, pH 5,5); 2-6 g de FP ; 35°C; 4 h.].....	34
Figura 23. Influência do tempo de reação. [252,1 mg (1 mmol) do substrato; 30 mL de <i>n</i> -hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K ₂ HPO ₄ (0,1 M/0,2 M, pH 5,5); 2-6 g de FP ; 35°C; 1-4 h.].....	35
Figura 24. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 27	46
Figura 25. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 28	47
Figura 26. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 29	48
Figura 27. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 30	49
Figura 28. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 31	50
Figura 29. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 32	51
Figura 30. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 33	52
Figura 31. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 34	53
Figura 32. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico 35	54
Figura 33. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico 36	55
Figura 34. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico 37	56
Figura 35. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico 38	57
Figura 36. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico 39	58

Figura 37. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico 40.....	59
Figura 38. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico 41.	60
Figura 39. Espectro de RMN- ¹ H (a) (400MHz, CDCL ₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico 42.	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM.....	4
Tabela 2. Dados analíticos de rendimento e ponto de fusão das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (27-34).....	23
Tabela 3. Dados analíticos de rendimento e caracterização espectroscópicas para os alcoóis racêmicos 35-42.....	26
Tabela 4. Influência do solvente orgânico em SB da reação de BH de 27.....	32
Tabela 5. Influência dos substituintes no anel A na BH das chalconas 27-34.....	36
Tabela 6. Influência da imobilização do fermento de pão na BH de 27.....	37

SIGLAS E ABREVIATURAS

α = alfa

$[\alpha]_D$ = Rotação ótica específica

β = beta

BH = bio-hidrogenação

δ = deslocamento

ccd = cromatografia de camada delgada

CG = cromatografia gasosa

CS = caseinato de sódio

Da = Dalton

FP = fermento de pão

IV = Infravermelho

J = constante de acoplamento

log P = logaritmo do coeficiente de partição

MHz = mega Hertz (10^6 Hertz)

MM = massa molar

Mont-K10 = montmorilonita K-10

NADH = (nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma reduzida)

NADPH = (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida)

PDB = Banco de Dados de Proteínas

PEO = poli(óxido de etileno)

PVA = poli(vinil álcool)

pf = ponto de fusão

Rf = índice de retenção

RMN- ^1H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

S. cerevisiae = *Saccharomyces cerevisiae*

SB = Sistema bifásico

sp = espécie não determinada

TMS = tetrametilsilano

UIBBM = União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Considerações gerais	2
2.2. Biocatalisadores	3
2.3. Classificação das enzimas	4
2.4. Imobilização das enzimas.....	7
2.5. Chalconas e compostos carbonílicos α,β -insaturados	8
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo Geral	11
3.2. Objetivos Específicos.....	11
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	12
4.1. Materiais e métodos.....	12
4.2. Procedimento geral para a preparação das chalconas 27-34	13
4.3. Procedimento geral para a obtenção dos alcoóis racêmicos 35-42.....	17
4.4. Procedimento geral para bio-hidrogenação (BH) das chalconas 27-34.....	17
4.5. Imobilização do fermento de pão	18
4.5.1. Preparação dos filmes com fermento de pão.....	18
4.5.2. Imobilização do FP em suporte cerâmico montmorilonita K-10 (mont K-10) .	19
4.5.3. Imobilização do FP em géis de Agar e gelatina	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Sínteses das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (27-34)	21
5.2. Redução das chalconas 27-34 com NaBH_4 para obtenção dos alcoóis racêmicos.....	25
5.3. Reações de BH das chalconas 27-34 utilizando FP	26
5.3.1. Quantificação da reação de BH de 27-34 por RMN- ^1H	28
5.3.2. Influência do tempo de reação de BH de 27 com FP em sistema bifásico (SB) ..	29
5.3.3. Influência da temperatura de reação de BH de 27	30
5.3.4. Influência do solvente orgânico no SB na reação de BH de 27	31
5.3.5. Influência do pH do SB da reação de BH de 27.....	33
5.3.6. Influência da massa de FP e do tempo da reação de BH de 27	34
5.4. Influência de substituintes na BH de 28-34 com FP em SB.....	35

5.5. Influência do suporte nas reações de BH de 27 com FP imobilizado	37
6. CONCLUSÃO.....	40
7. PERSPECTIVAS.....	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO 1.....	46
ANEXO 2.....	62

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com o intuito de se obter produtos com maior pureza e utilizando métodos ambientalmente corretos, a ciência tem realizado grandes avanços nas pesquisas de novos catalisadores para as mais diversas reações químicas. Dentre estes avanços, encontra-se a utilização de microorganismos e enzimas como catalisadores, os quais possuem um alto grau de especificidade em relação aos substratos, resultando assim em maior pureza do produto.

Por muitos anos, a utilização de biocatalisadores foi pouco utilizada pelas indústrias químicas, devido às limitações deste método, como sua baixa tolerância a solventes orgânicos, temperaturas e pHs extremos. No entanto, estas limitações estão sendo contornadas, e o interesse das indústrias e das áreas acadêmicas pelos biocatalisadores vem crescendo exponencialmente.

Os biocatalisadores mais comuns são as enzimas, fungos, bactérias e microorganismos, como a levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como fermento de pão, alvo da presente pesquisa. O fermento de pão é utilizado desde a antiguidade na panificação e produção de vinhos e cervejas, e são importantes em pesquisas na área de Química Orgânica por produzirem principalmente enzimas capazes de catalisar reações de redução ou bio-hidrogenação.

As enzimas são capazes de catalisar reações na ordem de até 10^{12} a 10^{14} vezes comparadas às reações sem catalisador e com rendimentos compatíveis aos catalisadores químicos. Como desvantagem do uso de enzimas, além das já citadas anteriormente, menciona-se que algumas necessitam da adição de cofatores, o que pode ser contornado utilizando células íntegras na reação.

Neste trabalho, serão estudadas e avaliadas as condições ideais de atuação do fermento de pão na reação de bio-hidrogenação de chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (piperonal), sintetizadas previamente em laboratório, bem como a especificidade do biocatalisador frente a estes substratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações gerais

Com os avanços da ciência e tecnologia, anualmente multiplica-se o número de novos compostos orgânicos e métodos utilizados publicados em revistas da área e meios de comunicação. Dentre os métodos em ascensão podem-se citar as reações que utilizam biocatalisadores, os quais estão cada vez mais inseridos em processos industriais para obtenção de compostos de interesse, principalmente os fármacos.¹

Os setores da indústria que mais utilizam biocatálise em reações de química fina são as indústrias químico-farmacêuticas, alimentícias e agrícolas, sendo que desde a década de 60 até hoje, o número de processos que utilizam biocatalisadores aumentou cerca de 35 vezes.¹

No entanto, as técnicas assistidas por biocatalisadores estão inseridas no cotidiano desde os primórdios da civilização. A descoberta da fermentação na panificação data da época dos egípcios, cerca de 4000 a.C., onde se deixava o pão ao ar. O fermento que contém uma quantidade enorme de microorganismos (leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*) encontra no pão o amido, e sendo estas condições ótimas para se alimentar, tem-se como consequência a quebra do amido em álcool e CO₂.^{2,3} Além deste processo, é possível citar a produção de vinho e cerveja, fermentados pela mesma levedura, além da aplicação em laticínios.

Entretanto, nestas aplicações eram usadas culturas de microorganismos mistos, sem isolamento das enzimas. Em 1862, L. Pasteur estabeleceu a base científica destas antigas aplicações, promovendo a oxidação do etanol a ácido acético, usando uma cultura pura de *Bacterium xylinum*. A ação redutora da levedura *S. cerevisiae* foi observada pela primeira vez por Dumas, em 1874. Ele constatou que a adição de enxofre finamente pulverizado a uma suspensão fresca de fermento biológico em uma solução de açúcar, desprendia sulfeto de hidrogênio.^{4,5}

Há cerca de 500 anos, o mecanismo de atuação de substâncias químicas no organismo vivo era totalmente desconhecido. A introdução de tais compostos químicos era feita na alimentação, terapia de doenças ou acidentalmente. Séculos mais tarde, com o

conhecimento da ciência moderna, o homem começou a purificar e identificar os compostos químicos que realmente faziam efeito no organismo. Daí surgiu a preocupação da indústria farmacêutica pela pureza enantiomérica dos fármacos. Alguns compostos opticamente puros apresentam diferentes funções para os enantiômeros, enquanto um age em benefício à saúde, o outro pode ser inativo ou ainda ter propriedades prejudiciais. Como exemplo, cita-se a talidomida, a qual é utilizada como analgésico. Enquanto o enantiômero *R*-(-) atua como analgésico, o *S*-(-) tem efeitos teratogênicos.^{4,6}

A utilização de cepas termo resistentes de *S. cerevisiae* também vem sendo empregada na produção de bioetanol a partir de glicose por Baeza *et al.* (2008), obtendo-se rendimentos consideráveis em produtos.⁷

As enzimas, em geral, apresentam excelente especificidade e eficiência em sínteses sendo possível a separação dos enantiômeros devido aos sítios catalíticos seletivos, e estereoespecíficos, que favorecem a formação de produtos enantiomericamente puros. As enzimas também atuam em condições reacionais relativamente brandas de temperatura e de pH.^{8,9}

2.2. Biocatalisadores

As enzimas são conhecidas industrialmente como biocatalisadoras e, em geral, são proteínas formadas de longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas e que exercem funções vitais nos organismos vivos. São geradas no interior da célula e retidas para funções intracelulares. Algumas podem ser extracelulares, sendo excretadas para fora dos limites da membrana celular de onde foram sintetizadas. As enzimas são especializadas na catálise de reações biológicas e estão entre as biomoléculas mais utilizadas devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos catalisadores fabricados pelos homens, podendo acelerar de 10^{12} a 10^{14} vezes se comparadas às reações na sua ausência. Estes catalisadores diminuem a barreira energética existente entre reagentes e produtos sem sofrer alterações permanentes em sua estrutura.^{8,10,11}

As reações que utilizam enzimas são facilmente reproduzíveis em laboratório, e são comparadas às que utilizam catalisadores químicos, visto que suas condições são brandas,

atuando em temperaturas na faixa de 30°C, pH \approx 7,0 e pressão atmosférica. Estas condições de atuação são próximas ou similares as que existem nas células vivas.^{8,9,11,12}

Uma das desvantagens no uso das enzimas, é que pode ocorrer desnaturação em solventes orgânicos. Para minimizar esta desvantagem é possível usar certa quantidade de água na reação e/ou utilizar métodos de imobilização.⁹

2.3. Classificação das enzimas

No Banco de Dados de Proteínas (PDB), encontram-se catalogados 54.076 tipos de macromoléculas (entre proteínas, peptídeos, vírus, carboidratos, ácidos nucleicos e complexos proteína/ácido nucleico). Várias enzimas têm sua sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios-X e RMN-2D.¹³

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM), as enzimas são divididas em seis grandes classes, e cada uma dessas em subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada. Estas classes estão apresentadas na **Tabela 1**.^{8,9,10}

Tabela 2. Classificação das enzimas de acordo com a UIBBM.

Número	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	<i>Oxirredutases</i>	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	<i>Desidrogenases</i> , oxidases, peroxidases
2	Transferases	Reações de transferência de grupos	Transaldolases, transcetolases
3	Hidrolases	Reações de hidrólise	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases
4	Liasas	Reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoacidolases, hidrolase
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases, oxirredutases, mutase
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e C-N e ésteres de fosfato	

Este trabalho utilizará um microorganismo que produz enzimas da classe das *oxirredutases*, a levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como fermento de pão. Esta levedura será usada como biocatalisador na bio-hidrogenação de chalconas derivadas do piperonal. Este microorganismo produz em seu interior enzimas com a capacidade de realizar diversos tipos de reações, como a redução, condensação, ciclização e oxidação, sendo que somente esta última não produz carbono aquiral.⁴

As principais enzimas redutoras produzidas pelo microorganismo são, em geral, as da classe das *desidrogenases* – as que substituem o borohidreto de sódio nas reações de redução a carbonila – e as *enona redutase*, as quais reduzem ligações duplas do tipo C=C, em carbonilas α,β -insaturadas. Nestas reações, elas requerem como cofator NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma reduzida) ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida), que tem um alto custo. Para contornar este problema, o uso de microorganismos vivos e íntegros tem sido utilizado para catalisar as reações em química orgânica.^{4,9}

Chu *et al.* (2006), estudaram o mecanismo de transferência do hidrogênio nas reações de redução de carbonilas α,β -insaturadas à correspondente carbonila saturada, obtendo-se bons rendimentos (>90%) e comprovando a ação do cofator NADPH e da água do meio reacional, como doadores de hidrogênio. (Figura 1)¹⁴

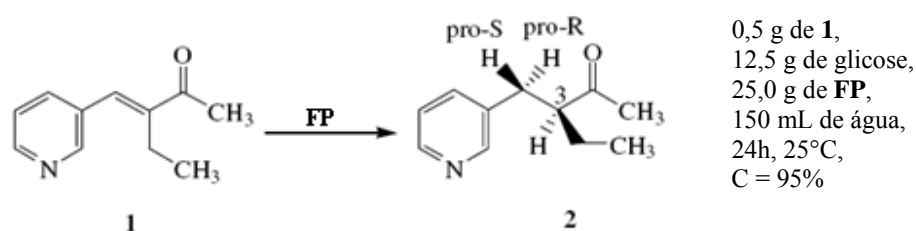


Figura 1. Redução da (*E*)-3-etil-4-(3-piridil)-3-buten-2-ona (**1**) utilizando **FP**.¹⁴

Recentemente, Assunção *et al.* (2008), reduziram uma série de aldeídos e cetonas usando suco de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), obtendo-se os produtos com bons excessos enantioméricos (25-100%).¹⁵ (Figura 2)

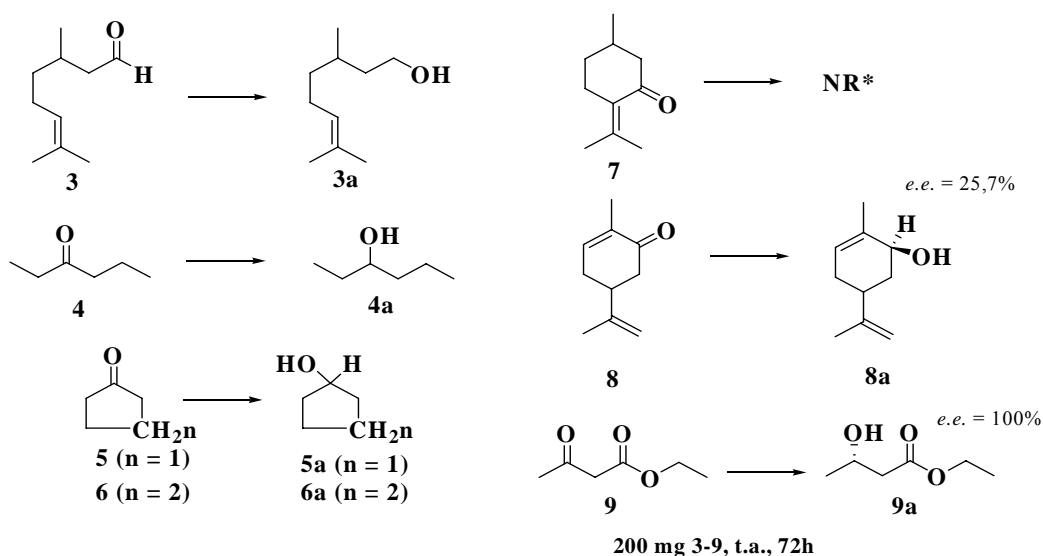


Figura 2. Redução de aldeídos e cetonas utilizando suco de cana de açúcar. (Adaptada da referência 15). *NR = não reduziu.

A escolha pelo fermento de pão, *S. cerevisiae*, como biocatalisador, deve-se a várias vantagens tais como a alta enantiosseletividade, rendimentos químicos compatíveis, vasta disponibilidade, custo acessível, não requer a adição de cofatores, pois os mesmos já estão disponíveis nas células, e a facilidade de manuseio. Além disso, não são necessários conhecimentos de microbiologia, o que faz com que alguns químicos desistam do uso de biocatalisadores em substituição ao uso de reagentes químicos mais bem conhecidos.^{4,5,16}

O meio aquoso é o mais freqüentemente utilizado nas reações de redução mediadas por microorganismos, pois dessa forma são mantidas as condições ambientais ideais para a sua sobrevivência. Entretanto, a solubilização do substrato no meio reacional e a posterior extração do produto formado tornam-se fatores limitantes ao processo, e podem ser superadas com o uso de solvente orgânico.^{9,17}

Para que as células mantenham sua atividade catalítica em solvente orgânico torna-se necessário protegê-las, e, portanto o emprego de técnicas de imobilização e/ou de proteção celular deve ser estudado para cada sistema.^{18,19,20}

Stambuk *et al.* (1998) e Dong *et al.* (2007), utilizaram a trealose em estudos da proteção celular do fermento de pão, pois este açúcar tem a função de estabilizar as membranas em condições de estresse.^{21,22}

2.4. Imobilização das enzimas

Uma maneira eficiente de proteger as células do meio orgânico é através da imobilização. As enzimas e os microorganismos estão sujeitos a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, como decorrência da estocagem ou mesmo durante o uso. Para manutenção da atividade catalítica, a técnica de imobilização em diferentes suportes é uma das mais utilizadas na biocatálise, sendo bastante aplicada para mediar reações de interesse sintético em solvente orgânico. A imobilização do biocatalisador, sem prejuízo de sua atividade por um razoável período de tempo, pode assegurar sua reciclagem e o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais.^{19,23,24}

Podem se citar alguns materiais que vem sendo usados como suportes, como a montmorilonita K-10^{20,25} e o alginato de cálcio.²⁶ Outros suportes já amplamente descritos na literatura são os filmes e géis poliméricos, os quais, em geral, protegem a parede celular das enzimas, mantendo a atividade catalítica, proporcionando em vários casos a possibilidade de reutilização, sem perda da atividade.²⁴

Outro método de imobilização que vem sendo bastante utilizado em biocatálise é o sistema bifásico. Este sistema é formado por uma fase aquosa onde as células são suspensas e por uma orgânica onde o substrato é solúvel, necessitando de agitação mecânica contínua para que a reação ocorra. As principais vantagens deste método incluem a facilidade na separação do biocatalisador do produto obtido, a minimização da inibição da atividade biocatalítica causada pelo substrato e a presença da fase aquosa, mais favorável ao biocatalisador do que o meio orgânico.^{9,23,27}

A **Figura 3** ilustra as principais técnicas de imobilização descritas na literatura.

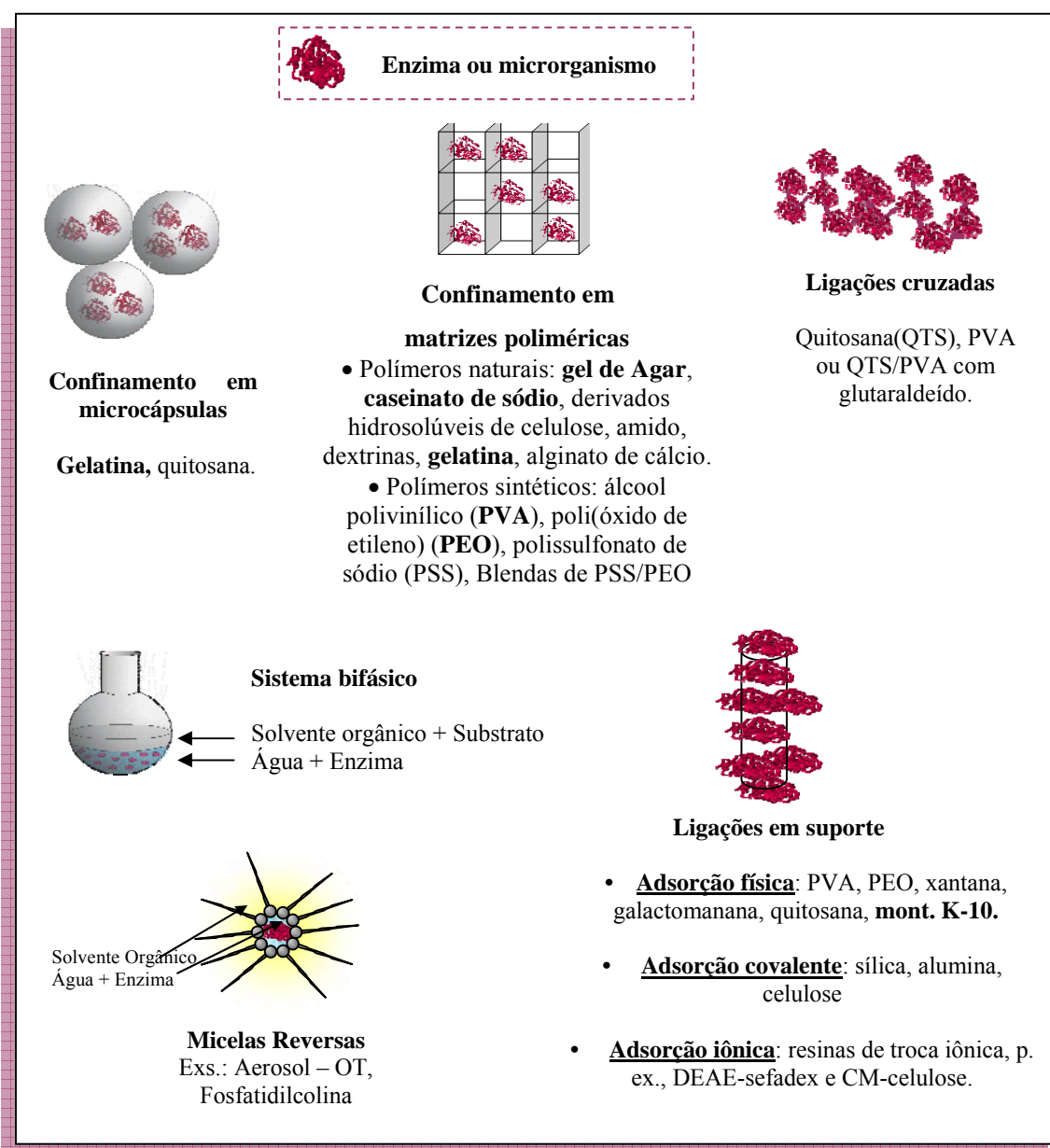


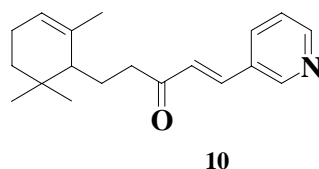
Figura 3. Métodos de imobilização de biocatalisadores (adaptada da referência 9).

2.5. Chalconas e compostos carbonílicos α,β -insaturados

As chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-ona) são substâncias naturais encontradas em diversas plantas ou preparadas sinteticamente, através de condensação aldólica cruzada. São compostos de grande interesse devido ao seu uso na construção de blocos químicos e, além disso, suas conhecidas propriedades farmacológicas e atividades biológicas. Algumas

chalconas exibem atividade anticancerígena, antiinflamatória, analgésica. Outras ainda apresentam potencial bactericida, antifúngico e agentes antiúlceras.^{28,29}

Suryawanshi *et al.* (2008), realizaram estudos com uma série de chalconas, entre elas, a 1-piridin-3-il-5-(2,6,6-trimetil-cicloex-2-enil)-pent-1-en-3-ona (**10**), a qual apresentou 100% de inibição da atividade da forma promastigota da *Leishmania donovani*.³⁰



A redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados derivados de aldeídos e cetonas, pode resultar na redução completa do sistema carbonílico α,β -insaturado com a formação do álcool saturado (**11**), redução exclusiva da carbonila levando ao álcool alílico correspondente (**12**) ou hidrogenação exclusiva da ligação dupla carbono-carbono com formação do aldeído ou cetona saturado(a) (**13**).³¹ (**Figura 4**)

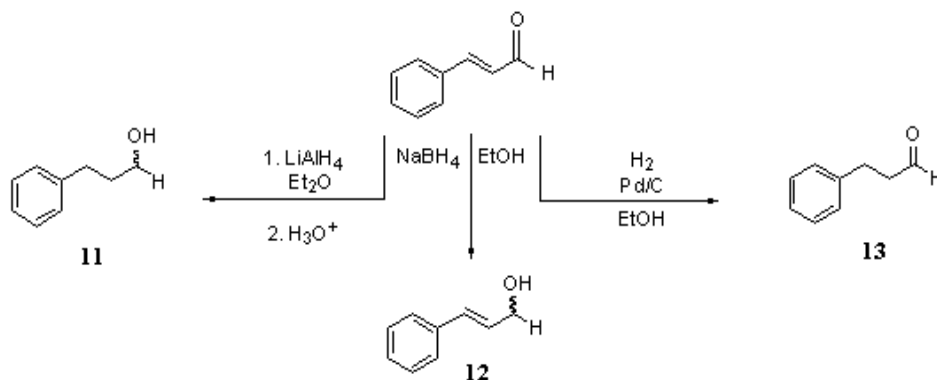


Figura 4. Produtos obtidos pela redução do cinamaldeído com diferentes sistemas.

A regiosseletividade da redução do cinamaldeído mostrou-se dependente do agente redutor e das condições de reação empregada. Pode-se observar que quando hidreto de alumínio e lítio e borohidreto de sódio (NaBH_4) foram utilizados como agentes redutores, ocorreu redução da carbonila formando álcoois saturados e insaturados, respectivamente. Quando a hidrogenação catalítica foi feita sob condições controladas, obtiveram-se exclusivamente os compostos carbonílicos saturados.³¹

É importante ressaltar que, quando hidretos metálicos são utilizados, ocorre a formação de mistura racêmica dos álcoois saturados e insaturados devido ao fato destes agentes redutores serem aquirais.³¹

Como citado anteriormente, o uso de biocatalisadores em reações de redução de compostos carbonílicos α,β -insaturados, surge como uma estratégia interessante para a obtenção de compostos com alta seletividade e pureza enantiomérica.

Clososki *et al.* (2007), reduziram uma série de ceto ésteres metilênicos, indicando a estreita relação entre as condições reacionais, efeito dos substituintes e a preferência de bio-hidrogenação das ligações C=O ou C=C, ou ambas.³² (Figura 5)

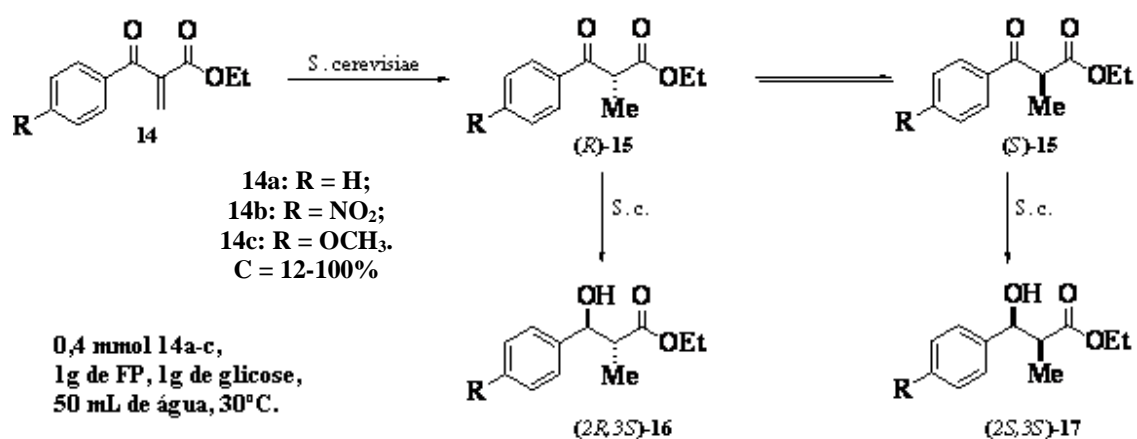


Figura 5. Redução de ceto ésteres (adaptada da referência 32).

Portanto, o uso do fermento de pão como biocatalisador é uma alternativa interessante e viável para a obtenção de compostos de interesse, em condições suaves de reação e alta seletividade.

Neste trabalho, a formação de cada um dos produtos obtidos através das reações biocatalisadas, será monitorada por várias técnicas de análises, tais como RMN-¹H e cromatografia gasosa (CG). Após a preparação e purificação, os compostos serão também caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN-¹H e IV, além das medidas de rotação óptica, α_D , quando necessário.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Sintetizar chalconas derivadas do piperonal (**27-34**) e realizar a reação de bio-hidrogenação (**BH**) em sistema bifásico e em meio orgânico, mediada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento de Pão, **FP**), imobilizada ou não.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar, purificar e caracterizar, por técnicas espectroscópicas, as chalconas derivadas do piperonal para serem utilizados como substratos na reação de **BH** mediada pela levedura de *S. cerevisiae*;
- ✓ Preparar, purificar e caracterizar por técnicas espectroscópicas e medidas de rotação óptica os álcoois padrões racêmicos, através da redução das correspondentes chalconas com borohidreto de sódio;
- ✓ Imobilizar o FP em montmorilonita K-10, filmes de PEO, PVA, CS, gelatina e géis de Agar e gelatina;
- ✓ Utilizar a levedura de *S. cerevisiae*, imobilizada ou não, como catalisador na **BH** da chalcona **27**, em diferentes sistemas biocatalíticos avaliando a influência da quantidade do FP imobilizado ou não, solvente orgânico no sistema bifásico, temperatura e pH;
- ✓ Utilizar as melhores condições reacionais obtidas para a chalcona **27**, nas reações de **BH** das chalconas **28-34**, para avaliar o efeito de grupos substituintes;
- ✓ Quantificar a formação dos produtos de **BH** por técnicas de RMN-¹H;
- ✓ Isolar, purificar e caracterizar por técnicas espectroscópicas os produtos obtidos nas reações de **BH**;
- ✓ Divulgar os resultados em congressos e revistas específicos da área.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Materiais e métodos

Todas as reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (**ccd**) (eluente hexano: acetato de etila; 80:20), utilizando placas de vidro com sílica gel 60 (Vetec – 0,63 – 0,200 mm), com visualização em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) e revelação em câmara de iodo.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H foram realizados em equipamento Varian AC 400F (400 MHz), tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Para todas as amostras analisadas utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente. Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos através de um espectrômetro Perkin Elmer FTIR 16PC, utilizando pastilha de KBr. O ponto de fusão dos compostos não foi corrigido e foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão, APF-301, Microquímica Equipamento Ltda. Para medidas de rotação ótica, α_D , utilizou-se o polarímetro Polartronic E Schmidt-Haensch. Para determinação do tempo de retenção dos produtos em CG quiral, foi utilizado o cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-14B) equipado com uma coluna capilar de fase estacionária quiral, CHROMPACK (CP-Chirasil - DEX CB 25 m x 0,25 mm ID x 0,25 μm).

Para o preparo da solução tampão utilizou-se ácido cítrico (CRQ) e K_2HPO_4 anidro (Vetec). Os solventes utilizados foram *n*-hexano e tolueno (F. Maia), *n*-heptano, acetonitrila, éter diisopropílico, tetracloreto de carbono e diclorometano (Vetec), álcool etílico (CRQ), álcool metílico (Nuclear), clorofórmio deuterado (Aldrich), *n*-butanol (Merck), *i*-propanol (Grupo Química). A solução de BRINE foi preparada com NaCl (Vetec). Utilizou-se também NaOH (Grupo Química), NaBH_4 (Aldrich) e MgSO_4 (Nuclear).

O aldeído utilizado para síntese das chalconas **27-34** foi o 3,4-metilenodioxibenzaldeído (piperonal) (Aldrich), e as acetofenonas: *m*-nitroacetofenona e *p*-nitroacetofenona (Acros Organics), *p*-metoxiacetofenona (Merck-Schuchardt), 3,4-

metilenodioxiacetofenona, *p*-bromoacetofenona, 3,4-dimetoxiacetofenona e 2,5-dimetoxiacetofenona (Aldrich), e a acetofenona (Riedel-Di-Haën).

Para imobilização do fermento de pão utilizou-se poli(óxido etileno) (**PEO**) (Acrós Organics, massa molar ponderal, M_w , 300.000 Da), poli(álcool vinílico) (**PVA**) (Vetec – M_w 85.300 Da), caseinato de sódio (**CS**) (Anchor), **Agar** (Isofar), gelatina (**G**) (Sigma) e montmorilonita K-10 (**mont-K10**) (Fluka). O fermento de pão comercial, utilizado como biocatalisador, foi da marca Fleischmann e adquirido nos supermercados locais.

Os demais equipamentos utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Banho termostático MicroQuímica MQBTZ99-20;
- ✓ Agitador magnético MicroQuímica MQAMA-301;
- ✓ Shaker Certomat MO (B. Braun Biotech International);
- ✓ Rota-evaporador Büchi 461;
- ✓ pHmetro Digimed DM20 μ P;
- ✓ Balança Marte A500;
- ✓ Balança analítica Sartorius Basic.

4.2. Procedimento geral para a preparação das chalconas 27-34

Para preparar as chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (piperonal), procedeu-se da seguinte forma: em um erlenmeyer de 125 mL, colocou-se o piperonal (**18**) (2,25 g; 15 mmol), a acetofenona substituída ou não (**19-26**) (15 mmol) e etanol (~40 mL). Dissolveram-se os reagentes sob agitação magnética à temperatura ambiente e, em seguida, gotejou-se NaOH 50% v/v, até a formação do precipitado. Depois de verificar por **ccd** o consumo total dos reagentes, a mistura reacional permaneceu refrigerada por uma noite, para total precipitação do produto. Posteriormente, filtrou-se em funil de Büchner e procedeu-se a recristalização das chalconas em etanol ou diclorometano a quente. A seguir, as chalconas obtidas foram devidamente analisadas para verificação de pureza por técnicas espectroscópicas de RMN- ^1H e IV, além de ponto de fusão. (**Figura 6**)

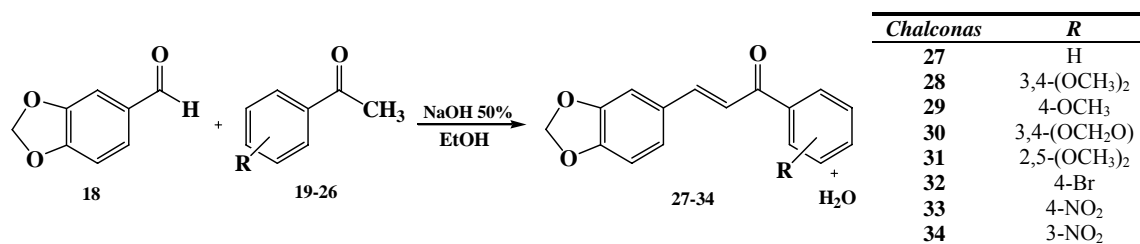
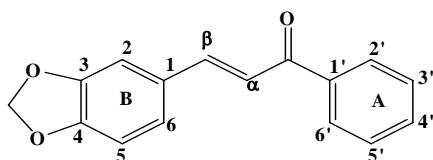


Figura 6. Preparação das chalconas **27-34** derivadas do piperonal.

(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona (27)

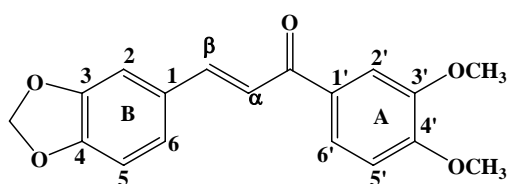


C₁₆H₁₂O₃, sólido amarelo claro, 94,5% de rendimento (3,57g); M.M.: 252,12 g.mol⁻¹; p.f.: 118-119°C (lit³³. p.f.: 118°C), R_f = 0,50 (hexano:acetato de etila, 80:20).

IV /cm⁻¹ 1663, 1224 (C=O), 1594 (C=C), 1252, 1015 (C-O), 3070, 2918, 1588, 1502, 1015, 777, 697 (Ar) (KBr).

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6,04 (s, 2H, -OCH₂O-), 6,85 (d, 1H, *J* = 8,00 Hz, H₅), 7,13 (d, 1H, *J* = 8,00 Hz, H₆), 7,18 (s, 1H, H₂), 7,37 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, H_α), 7,48-7,58 (m, 3H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}), 7,74 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, H_β), 8,00 (d, 2H, *J* = 6,8 Hz, H_{2'}, H_{6'}).

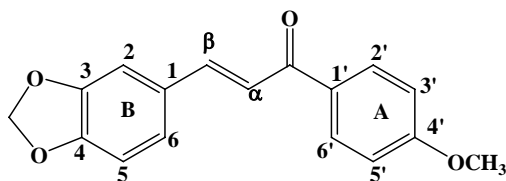
(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona (28)



C₁₈H₁₆O₅, sólido amarelo claro, 92,1% de rendimento (4,31g); M.M.: 312,16g.mol⁻¹; p.f.: 140-141°C (lit³³. p.f.: 143°C), R_f = 0,27 (hexano:acetato de etila, 80:20).

IV /cm⁻¹ 1652 (C=O), 1611 (C=C), 1249, 1036 (C-O), 3074, 2907, 1584, 1495, 1443, 1359, 1095, 1036, 983, 926, 794 (Ar) (KBr).

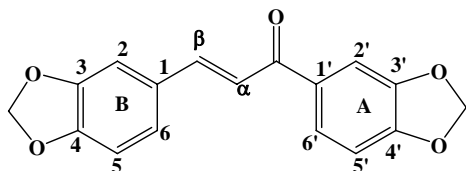
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3,98 (s, 6H, 3',4'-OCH₃), 6,04 (s, 2H, -OCH₂O-), 6,85 (d, 1H, *J* = 8,00 Hz, H₅), 6,93 (d, 1H, *J* = 8,00 Hz, H₆), 7,18 (s, 1H, H₂), 7,40 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, H_α), 7,67 (d, 1H, *J* = 8,00 Hz, H_{5'}), 7,74 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, H_β), 7,622 (s, 1H, H_{2'}), 7,14 (d, 1H, *J* = 8,00 Hz, H_{6'}).

(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(4'-metoxi-fenil)-2-propen-1-ona (29)

$C_{17}H_{14}O_4$, sólido amarelo claro, 87,4% de rendimento (3,70g); M.M.: $282,14 \text{ g.mol}^{-1}$; p.f.: $127-129^\circ\text{C}$ (lit³³. p.f.: 130°C), Rf = 0,45 (hexano:acetato de etila, 80:20).

IV $/\text{cm}^{-1}$ 1656 (C=O), 1583 (C=C), 1240, 1216, 1040, 1022 (C-O), 2965, 2841, 1595, 1503, 1464, 1413, 1096, 992, 931, 791 (Ar) (KBr).

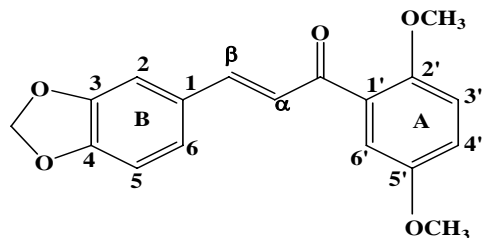
RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3,89 (s, 3H, -4'- OCH_3), 6,03 (s, 2H, - OCH_2O -), 6,84 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H5), 7,12 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H6), 7,17 (s, 1H, H2), 7,38 (d, 1H, $J = 15,6 \text{ Hz}$, H α), 6,98 (d, 2H, $J = 8,8 \text{ Hz}$ H3', H5'), 7,73 (d, 1H, $J = 15,6 \text{ Hz}$, H β), 8,03 (d, 2H, $J = 8,8 \text{ Hz}$, H2', H6').

(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-metilenodioxi-fenil)-2-propen-1-ona (30)

$C_{17}H_{12}O_5$, sólido amarelo claro, 83,2% de rendimento (3,69g); M.M.: $296,12 \text{ g.mol}^{-1}$; p.f.: $173-175^\circ\text{C}$ (lit³³. p.f.: 176°C), Rf = 0,35 (hexano:acetato de etila, 80:20).

IV $/\text{cm}^{-1}$ 1652 (C=O), 1580 (C=C), 1270, 1154, 1037, 1024 (C-O), 3011, 2837, 1596, 1504, 1473, 1416, 1097, 979, 925, 793 (Ar) (KBr).

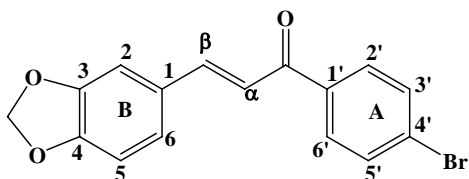
RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6,07 (s, 2H, - OCH_2O -, A), 6,03 (s, 2H, - OCH_2O -, B), 6,85 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H5), 6,89 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H5'), 7,12 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H6), 7,16 (s, 1H, H2), 7,33 (d, 1H, $J = 15,6 \text{ Hz}$, H α), 7,53 (s, 1H, H2'), 7,64 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H6'), 7,72 (d, 1H, $J = 15,6 \text{ Hz}$, H β).

(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(2',5'-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona (31)

$C_{18}H_{16}O_5$, sólido amarelo claro, 93,7% de rendimento (4,38g); M.M.: $312,16 \text{ g.mol}^{-1}$; p.f.: $94-96^\circ\text{C}$ (lit³³. p.f.: 101°C), Rf = 0,39 (hexano:acetato de etila, 80:20).

IV $/\text{cm}^{-1}$ 1652 (C=O), 1582 (C=C), 1250, 1225, 1047, 1027 (C-O), 2996, 2838, 1606, 1495, 1445, 1415, 1101, 977, 834, 726 (Ar) (KBr).

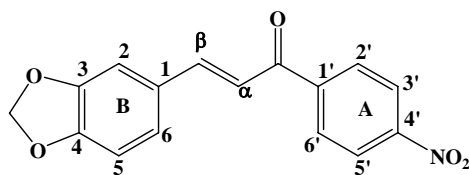
RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3,86 (d, 6H, 2',5'- OCH_3), 6,02 (s, 2H, - OCH_2O -), 6,83 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H5), 7,07 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H6), 7,12 (s, 1H, H2), 7,25 (d, 1H, $J = 15,6 \text{ Hz}$, H α), 6,83 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H3'), 7,08 (d, 1H, $J = 8,00 \text{ Hz}$, H4'), 7,12 (s, 1H, H6'), 7,57 (d, 1H, $J = 16,0 \text{ Hz}$, H β).

(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(4'-bromo-fenil)-2-propen-1-ona (32)

$C_{16}H_{11}O_3Br$, sólido amarelo claro, 88,52% de rendimento (4,395 g); M.M.: $331,01 g \cdot mol^{-1}$; p.f.: $134-135^\circ C$ (lit³³). p.f.: $135^\circ C$, Rf = 0,33 (hexano:acetato de etila, 80:20).

IV $/cm^{-1}$ 1657 (C=O), 1598 (C=C), 1252, 1027 (C-O), 2882, 2779, 1496, 1446, 1396, 1098, 984, 938, 804 (Ar) (KBr).

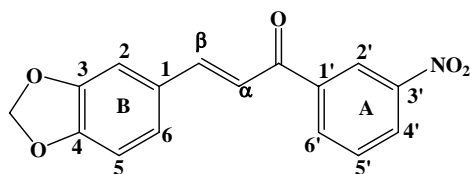
RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 5,95 (s, 2H, -OCH₂O-), 6,77 (d, 1H, J = 8,00 Hz, H5), 7,04 (d, 1H, J = 8,00 Hz, H6), 7,18 (s, 1H, H2), 7,22 (d, 1H, J = 15,6 Hz, H α), 7,55 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H3', H5'), 7,66 (d, 1H, J = 15,6 Hz, H β), 7,79 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H2', H6').

(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(4'-nitro-fenil)-2-propen-1-ona (33)

$C_{16}H_{11}O_5N$, sólido amarelo forte, 84,2% de rendimento (3,75g); M.M.: $297,11 g \cdot mol^{-1}$; p.f.: $204-206^\circ C$ (lit³³). p.f.: $206^\circ C$, Rf = 0,38 (hexano:acetato de etila, 80:20).

IV $/cm^{-1}$ 1657(C=O), 1575 (C=C), 1250, 1041(C-O), 1525, 1344, 848 (N=O), 3119, 2919, 1604, 1497, 1447, 1108, 1010, 931, 799 (Ar) (KBr).

RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 5,80 (s, 2H, -OCH₂O-), 6,61 (d, 1H, J = 8,00 Hz, H5), 6,89 (d, 1H, J = 8,00 Hz, H6), 6,92 (s, 1H, H2), 7,52 (d, 1H, J = 15,6 Hz, H α), 7,87 (d, 2H, J = 7,2 Hz, H2', H6'), 7,74 (d, 1H, J = 15,6 Hz, H β), 8,09 (d, 2H, J = 6,8 Hz, H3', H5').

(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3'-nitro-fenil)-2-propen-1-ona (34)

$C_{16}H_{11}O_5N$, sólido amarelo forte, 87,1% de rendimento (3,88g); M.M.: $297,11 g \cdot mol^{-1}$; p.f.: $148-149^\circ C$ (lit³³). p.f.: não consta, Rf = 0,42 (hexano:acetato de etila, 80:20).

IV $/cm^{-1}$ 1664 (C=O), 1587 (C=C), 1246, 1033 (C-O), 1528, 1346, 852 (N=O), 3080, 2919, 1609, 1506, 1492, 1446, 1103, 929, 809, 698 (Ar) (KBr).

RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 6,03 (s, 2H, -OCH₂O-), 6,85 (d, 1H, J = 8,00 Hz, H5), 7,14 (d, 1H, J = 8,00 Hz, H6), 7,18 (s, 1H, H2), 7,34 (d, 1H, J = 15,6 Hz, H α), 7,69 (t, 1H, H5'), 7,79 (d, 1H, J = 15,6 Hz, H β), 8,32 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 8,41 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H6'), 8,80 (s, 1H, H2').

4.3. Procedimento geral para a obtenção dos alcoóis racêmicos 35-42

Para obtenção dos alcoóis racêmicos padrões, foram pesados 1,00 g de cada chalcona (**27-34**) e transferidas para erlenmeyers de 125 mL, foi adicionado 30 mL de metanol e, sob agitação, adicionou-se o hidreto metálico NaBH₄ em excesso molar (2,5 equivalentes). Depois de verificar por **ccd** o completo consumo do substrato, a mistura reacional permaneceu sob agitação por mais duas horas e, posteriormente, o solvente orgânico foi evaporado em rota evaporador. O precipitado foi então novamente solubilizado em diclorometano e lavado com solução saturada de NaCl (BRINE). Após separação, secou-se o solvente orgânico com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), e este foi filtrado e evaporado. Foram realizadas as mesmas técnicas de caracterização da síntese das chalconas, além de medidas de rotação específica (α_D), para comprovar a obtenção do álcool racêmico. (**Figura 7**)

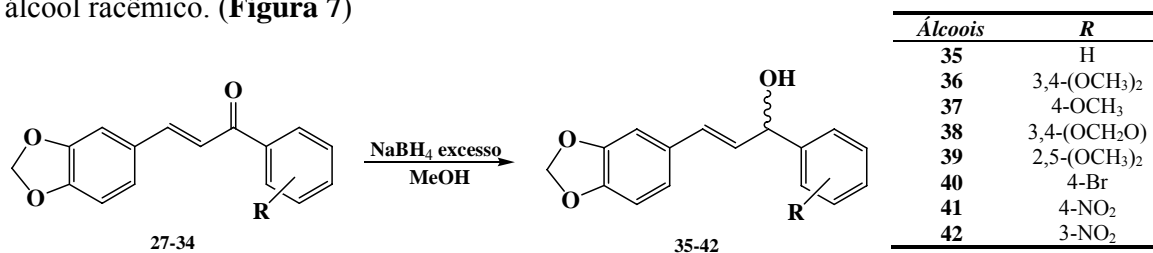


Figura 7. Preparação dos alcoóis racêmicos derivados das chalconas **27-34**.

4.4. Procedimento geral para bio-hidrogenação (BH) das chalconas 27-34

O procedimento geral usado na **BH** das chalconas (**27-34**), foi o seguinte: em um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 1 mmol de substrato (**27-34**) em 30 mL de solvente orgânico, sob agitação mecânica constante (ou shaker orbital nos casos do **FP** imobilizado em suportes), na faixa de temperatura (T) de 25 – 50 °C. Posteriormente, adicionou-se 30 mL de tampão ácido cítrico/fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) variando pH de 3,5 – 8,5, e 2 – 6 g de fermento de pão (Fleischmann®). Foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados das fases aquosa e orgânica e, a seguir, procedeu-se com a extração primeiramente com *n*-hexano e, em seguida, com diclorometano. Secou-se então a fase orgânica com MgSO₄, procedendo com a filtração e evaporação em rota-evaporador. A

formação do produto de **BH** foi verificada por **ccd**, e as conversões dos substratos em produtos foram quantificadas por técnica espectroscópica de RMN- ^1H e CG-fase quiral.

4.5. Imobilização do fermento de pão

Para verificar a manutenção da atividade catalítica do fermento de pão imobilizado, foram utilizados diferentes suportes, sendo eles na forma de géis, cerâmica ou filmes poliméricos.

4.5.1. Preparação dos filmes com fermento de pão

O procedimento geral para preparação dos filmes de poli(óxido de etileno) (**PEO**), poli(álcool vinílico) (**PVA**), caseinato de sódio (**CS**) e gelatina (**G**) foi o seguinte: adicionou-se 500 mg de **PEO** ou **PVA**, 2,5 g de **CS** ou 1,0 g de gelatina em béqueres de 50 mL e 20 mL de água destilada. Os filmes de **PEO**, **PVA** e **CS**, necessitaram de agitação magnética constante até solubilização do suporte, para o filme de gelatina e **PVA** ainda foi necessário leve aquecimento ($\sim 40^\circ\text{C}$) para total solubilização. Em seguida, foram adicionados 4,0 g de **FP** à solução dos filmes, seguido da homogeneização dos sistemas. A seguir, a mistura foi colocada em placa de Petri (~ 9 cm de diâmetro) e levada à capela para evaporação do solvente. (**Figura 8**)

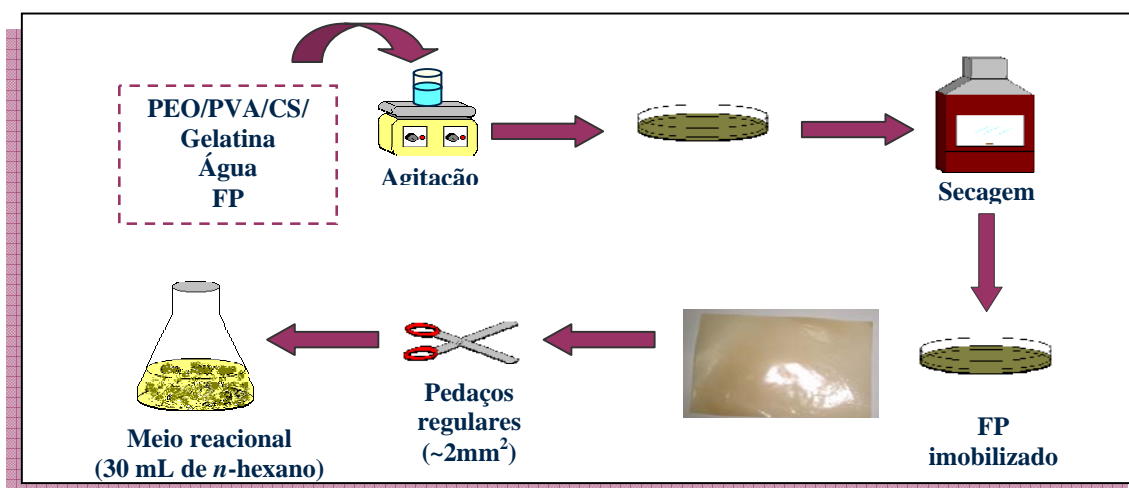


Figura 8. Imobilização do **FP** em diferentes materiais poliméricos.

4.5.2. Imobilização do FP em suporte cerâmico montmorilonita K-10 (mont K-10)

A imobilização do **FP** em mont-K10 foi realizada em um béquer de 600 mL. Primeiramente, foram adicionados 40,0 g do biocatalisador em 250 mL de água destilada (agitação \pm 10 minutos). Em seguida, adicionaram-se 60,0 g de mont-K10 e deixou-se o sistema sob agitação magnética vigorosa por cerca de 20 horas. A mistura **FP**/mont-K10 foi então filtrada em funil de Büchner, colocada em uma forma de vidro (20x30 cm), para secagem sob corrente de ar e depois, triturada até a obtenção de partículas finas. (**Figura 9**)

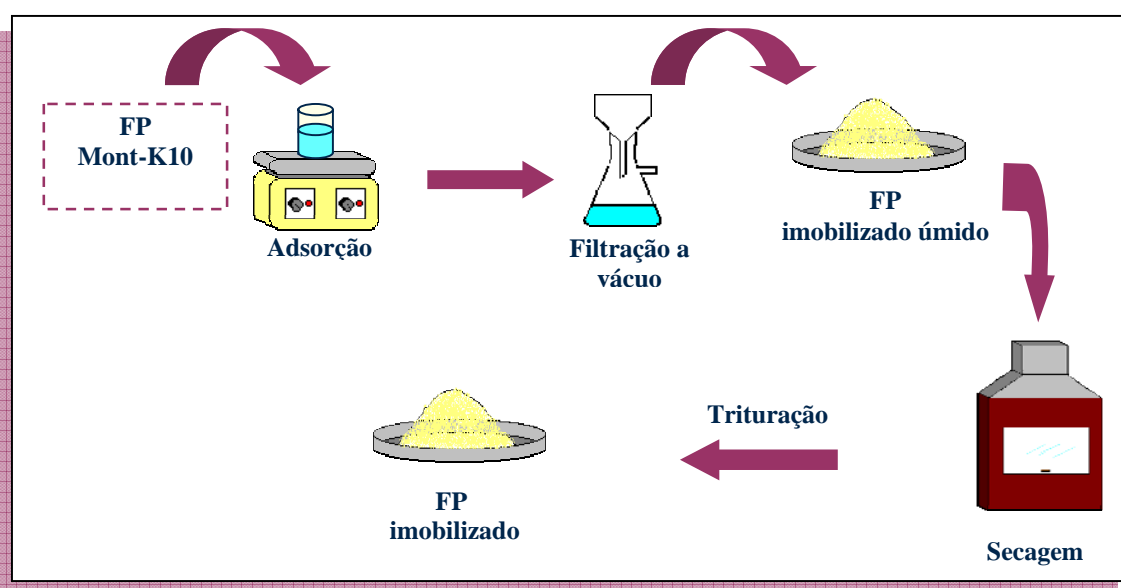


Figura 9. Imobilização do FP em montmorilonita K-10.

4.5.3. Imobilização do FP em géis de Agar e gelatina

A preparação dos géis procedeu-se da seguinte forma: em béqueres de 50 mL adicionaram-se 1,0 g de gel de Agar ou 3,0 g de gelatina (**G**) a 20 mL de água destilada. Os sistemas foram aquecidos para solubilização dos polímeros e, após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 4,0 g de **FP** sob agitação constante até homogeneização. Para formação do gel, estes foram levados à geladeira por 2h horas e, posteriormente, passados em uma peneira com cerca de 1 mm², obtendo-se os cubos pequenos com o **FP** imobilizado. (**Figura 10**)

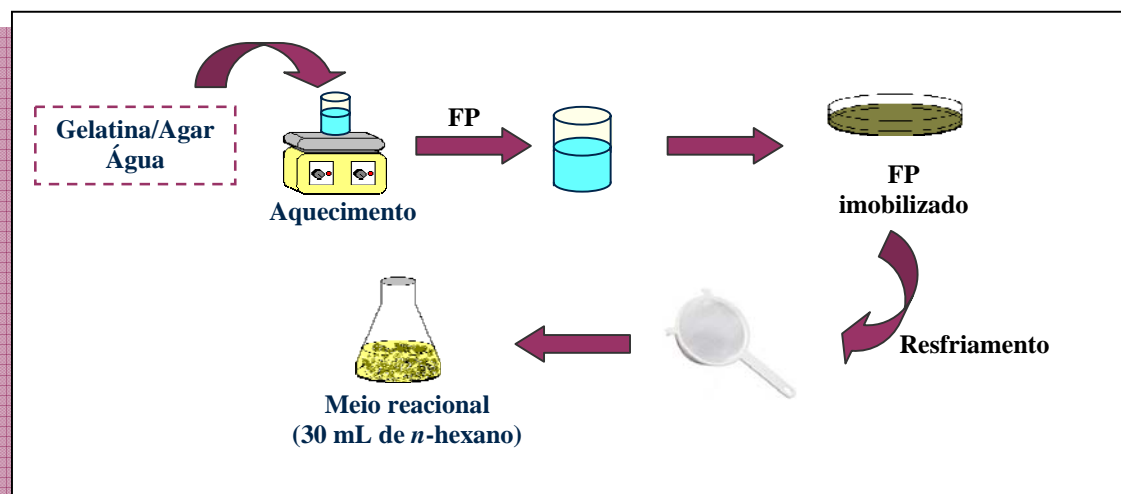


Figura 10. Imobilização do FP em gel de Agar e gelatina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão apresentados os resultados obtidos para as sínteses das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído, bem como a redução destas *via* química e enzimática. Primeiramente, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos da síntese e caracterização das chalconas **27-34** e, posteriormente a redução com NaBH₄ das correspondentes chalconas. A seguir, serão abordados os dados referentes às reações com a levedura de *Saccharomyces cerevisiae* (**FP**) em sistema bifásico ou em meio orgânico. Foi avaliada a influência do pH da fase aquosa, solvente orgânico, temperatura, tempo de reação e massa de biocatalisador. Após a otimização das condições experimentais da reação de **BH** da chalcona **27**, mediada por **FP**, verificou-se a influência de grupos substituintes no anel aromático **A** das chalconas **27-34**. Em outro estudo, verificou-se o melhor método de imobilização do FP em diferentes suportes.

Os dados obtidos foram comparados com alguns reportados na literatura.

5.1. Sínteses das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (27-34)

As chalconas **27-34** foram sintetizadas pelo método de condensação aldólica, conforme apresentado na **Figura 11**.

Primeiramente, ocorreu a etapa de desprotonação, onde a base removeu um hidrogênio α -ácido da cetona para formar o correspondente íon enolato, estabilizado por ressonância. Através de um ataque nucleofílico, o íon enolato reage com a molécula de aldeído (na posição alfa ao grupo carbonila eletrofílico), formando um íon alcóxido (intermediário tetraédrico). A protonação do íon alcóxido gerou o produto de condensação e regenerou o catalisador básico.

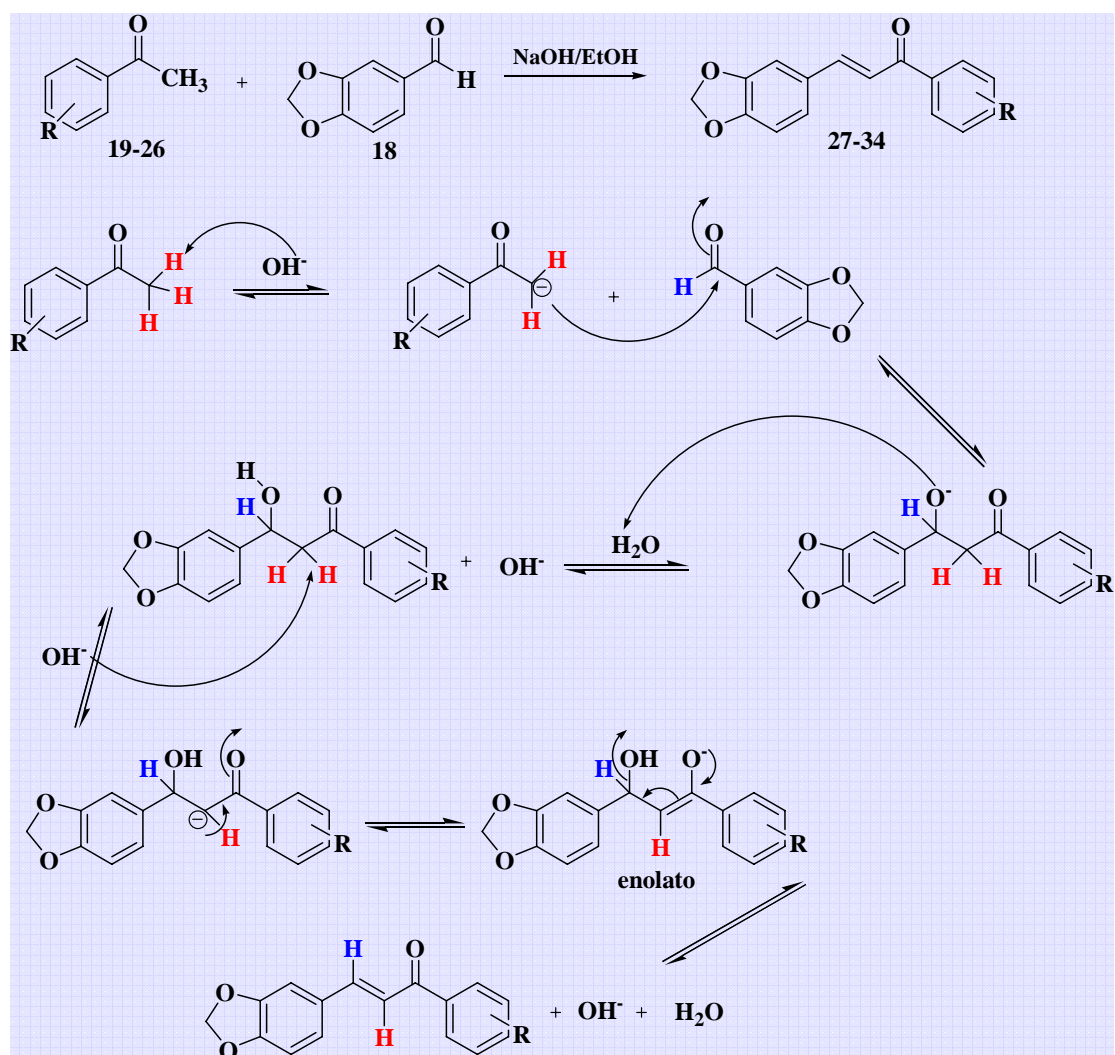


Figura 11. Mecanismo geral de formação das chalconas 27-34.

A formação da enona conjugada ocorreu por desidratação, que pode ser catalisada por base ou por ácido. Neste caso, em condições básicas, um hidrogênio ácido foi abstraído da posição alfa para resultar em um íon enolato, que eliminou o grupo de saída $-\text{OH}$, formando a chalcona. Em condições ácidas, seria formado o enol, o grupo $-\text{OH}$ seria protonado e a água eliminada.

Todas as chalconas 27-34 foram sintetizadas conforme citado anteriormente nos Procedimentos Experimentais, páginas 13 e 14. Os compostos foram analisados por técnicas espectroscópicas de RMN- ^1H e IV e determinação do ponto de fusão. Os dados analíticos de rendimento e ponto de fusão das chalconas 27-34 estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Dados analíticos de rendimento e ponto de fusão das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (**27-34**).

Composto	R	Rendimento (%)	p.f. (°C)	p.f. (°C)	Nº Registro CHEMCATS
			Exp.	Lit. ³³	
27	H	94,5	118-119	118	644-34-8
28	3,4-(OCH ₃) ₂	92,1	140-141	143	51116-22-4
29	4-OCH ₃	87,4	127-129	130	2373-93-5
30	3,4-(OCH ₂ O)	83,2	173-175	176	76530-89-7
31	2,5-(OCH ₃) ₂	93,7	94-96	101	58344-61-9
32	4-Br	88,5	134-135	135	36716-01-5
33	4- NO ₂	84,2	204-206	206	92858-63-4
34	3- NO ₂	87,1	148-149	*	215778-54-4

CHEMCATS = número de registro no CAS, obtido no SciFinder. * p.F. não encontrado na literatura.

Todas as chalconas foram obtidas com bons rendimentos, sendo de 83,2-94,5%. Os pontos de fusão obtidos experimentalmente são concordantes com os citados na literatura, apresentando-se algumas vezes menores em algumas unidades de °C, possivelmente por não estarem corrigidos.

Como exemplo, será realizada a análise dos espectros de RMN-¹H e IV da chalcona **27**. Estes espectros estão apresentados nas **Figuras 12 e 13**.

Na análise do espectro de RMN-¹H pode-se observar um singlete em 6,04 ppm referente aos dois hidrogênios da unidade metilenodioxi. Os sinais dos dois hidrogênios 5 e 6 aparecem em 6,85 e 7,13 ppm, respectivamente como dois dubletos ($J = 8,00$ Hz). Em 7,18 ppm observa-se um singlete referente ao hidrogênio 2. Centrado em 7,50 e 7,58 observam-se dois duplo-dubletos distorcidos, referente aos hidrogênios 3', 4' e 5'. Centrado em 8,01 ppm, observa-se um dubleto ($J = 7,2$ Hz) referente aos dois hidrogênios 2' e 6'. Os deslocamentos referentes aos hidrogênios α e β , são observados como dois dubletos em 7,37 e 7,74 ppm, respectivamente, com $J = 15,6$ Hz, evidenciando a configuração *E* da chalcona **27**.³⁴

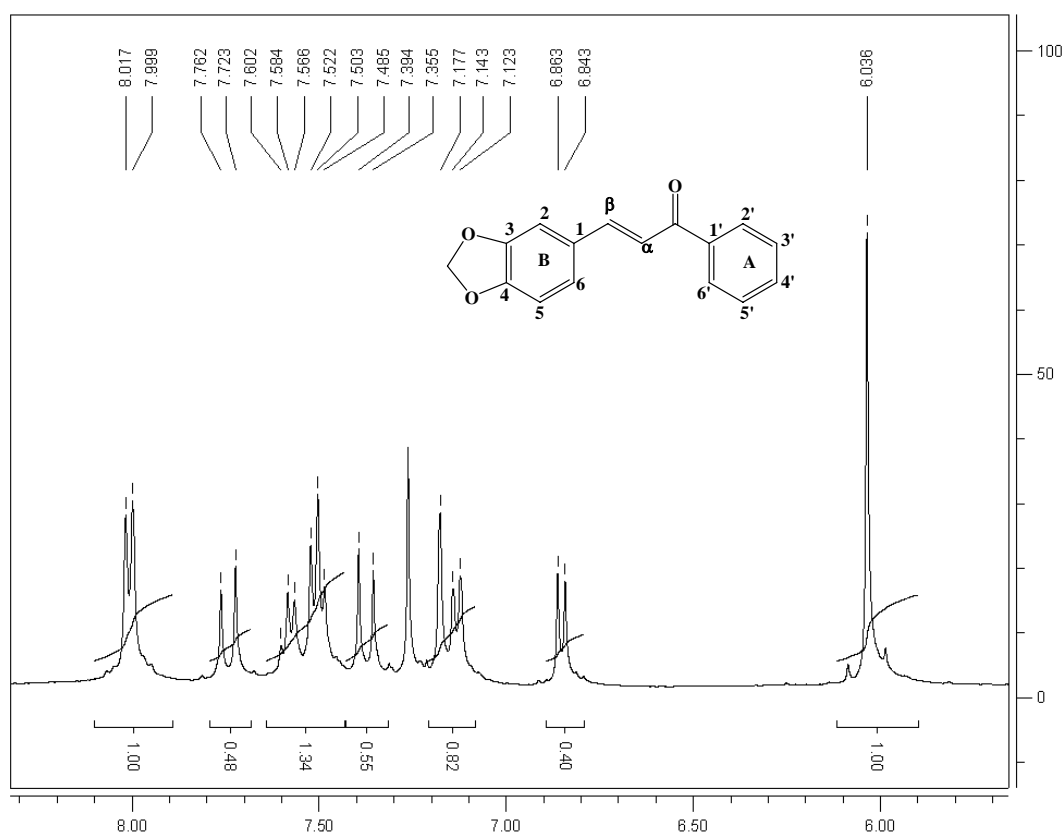


Figura 12. Espectro de RMN- ^1H da chalcona **27** em CDCl_3 . (400 MHz)

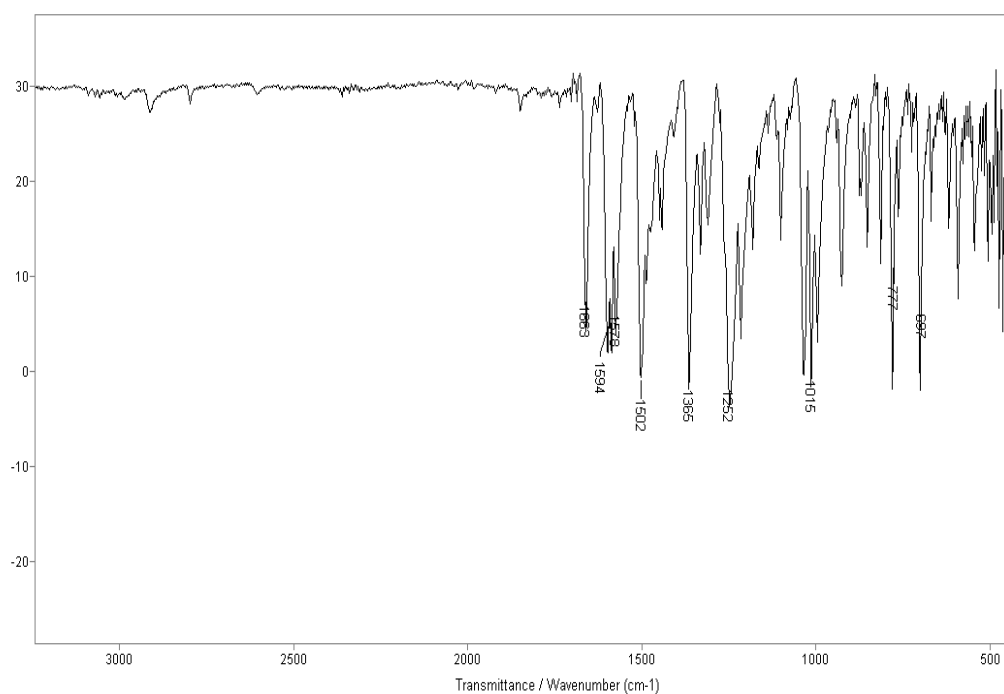


Figura 13. Espectro de infravermelho da chalcona **27**. (KBr)

No espectro de absorção na região do infravermelho (IV), as bandas mais características da chalcona **27** são as da carbonila (C=O) da cetona conjugada em 1663, da dupla ligação (C=C) em 1594 e a da ligação C–O em 1252 e 1015 cm^{-1} .

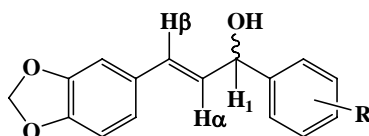
Para as demais chalconas (**28-34**), os espectros de RMN- ^1H e IV apresentaram similaridade nos sinais típicos que evidenciam a formação da ligação C=C α,β à carbonila, bem como as correspondentes a carbonila e anel aromático (ver dados nas páginas 14-16).

Estes resultados, associados às análises de RMN- ^1H e IV, comprovam a obtenção e pureza das chalconas **27-34**. Os espectros de RMN- ^1H e IV estão apresentados nos Anexo I (Figuras 24-31).

5.2. Redução das chalconas 27-34 com NaBH_4 para obtenção dos alcoóis racêmicos

Para a obtenção dos alcoóis que serão utilizados como padrões nas análises de RMN- ^1H e cromatografia gasosa, realizou-se a redução das chalconas (**27-34**) com NaBH_4 . Na Tabela 3 estão apresentados os dados analíticos de rendimentos, bem como as bandas características na região do infravermelho e os picos no espectro de RMN- ^1H . (Anexo I – Figuras 32-39)

Tabela 3. Dados analíticos de rendimentos e caracterização espectroscópica para os alcoóis racêmicos **35-42**.



Álcool	Rendimento (%)	IV (cm^{-1}) (-OH);(-C=C-)	RMN- ^1H (ppm)
			H β d (J Hz); H α dd (J Hz); H $_1$ d (J Hz)
35	91,3	3397; 1608	6,593 (15,6); 6,201 (15,6; 6,4); 5,294 (6,4)
36	92,4	3443; 1604	6,536 (16,0); 6,182 (16,0; 6,4); 5,253 (6,4)
37	89,2	3478; 1614	6,543 (15,6); 6,200 (15,6; 6,4); 5,275 (6,4)
38	90,4	3429; 1604	5,734 (16,0); 5,408 [*] ; 4,149 [*]
39	87,9	3355; 1606	6,561 (15,6); 6,140 (15,6; 6,8); 5,297 [*]
40	87,0	3360; 1608	6,556 (16,0); 6,283 (16,0; 5,6); 5,509 (5,6)
41	89,2	3470; 1601	5,487 (15,6); 5,051 (15,6; 6,8); 4,292(6,8)
42	88,3	3393; 1610	6,580 (15,6); 6,116 (15,6; 7,2); 5,410 [*]

^{*} Não foi possível calcular a constante de acoplamento (J).

Os alcoóis foram obtidos com bons rendimentos, sendo de 87,0-92,4%. Os espectros de RMN- ^1H apresentaram sinais característicos da formação dos alcoóis tais como, um dubleto em 6,52 ppm ($J = 15,6\text{Hz}$) referente ao H_β , um duplo dubleto em $\sim 6,2$ ppm ($J = 15,6$ e ~ 6 Hz) referente ao H_α e um dubleto em $\sim 4,27$ ppm ($J \sim 6$ Hz), referente ao H_1 . Nos espectros de IV, foram observadas bandas características em aproximadamente 3400 (νOH) e em $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C}=\text{C}$). As análises de RMN- ^1H aliadas às de IV, comprovam a formação dos alcoóis. Foram realizadas medidas de rotação ótica específica, e os alcoóis **35-42** apresentaram $[\alpha]_D = 0$, evidenciando a formação da mistura racêmica. Este é um resultado esperado, considerando que o NaBH_4 é um agente redutor aquiral.³¹

5.3. Reações de BH das chalconas **27-34** utilizando FP

A **BH** das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído **27-34** pode formar o correspondente álcool saturado (**43-50**), o álcool alílico (**51-58**) ou o produto exclusivo da hidrogenação da ligação dupla carbono-carbono (**59-66**). (Figura 14)

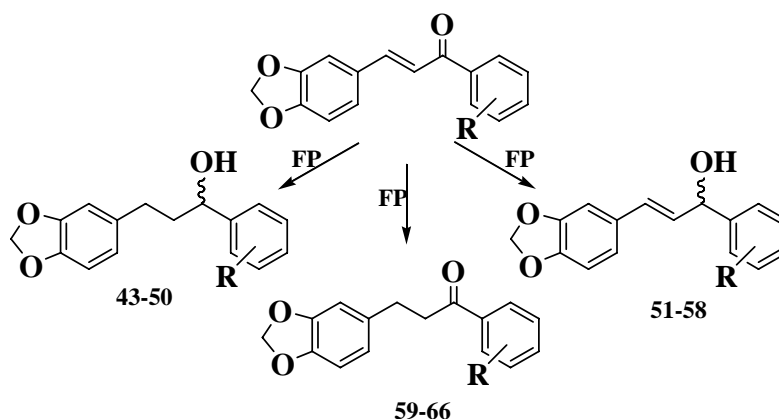


Figura 14. BH das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído.

Após isolamento do produto da reação de **BH** de **27**, foram realizadas análises de RMN- ^1H e CG-quiral, e estão apresentadas nas **Figuras 15 e 16**.

Nas análises de RMN- ^1H foram observados dois tripletos centrados em 3,26 e 2,99 ppm referentes aos hidrogênios α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , respectivamente. Em 5,92 ppm encontra-se o singlete referente aos dois hidrogênios do grupo metilenodioxi. Os sinais centrados em

6,73, 7,45 e 7,56 ppm, referem-se aos hidrogênios 2, 5, 6, 3', 4', 5'. O duplete centrado em 7,96 refere-se aos hidrogênios 2' e 6'.

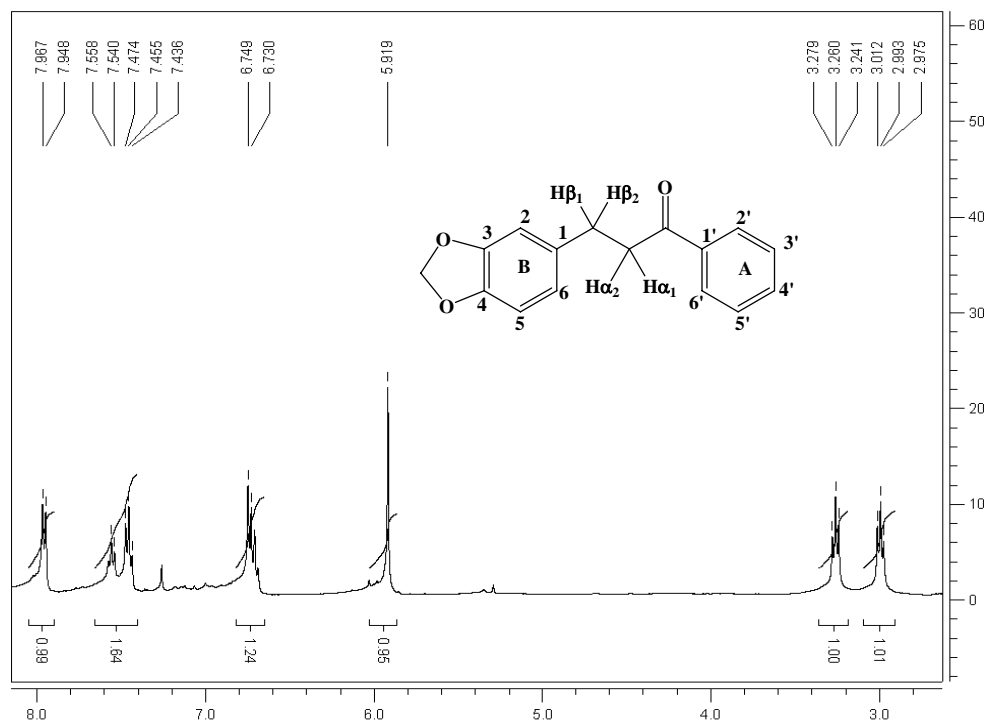


Figura 15. Espectro de RMN- ^1H do produto da reação de BH de **27**, catalisada por **FP**, em CDCl_3 . (400 MHz)

Para verificar a formação do produto obtido da **BH** de **27** foram realizadas análises em CG-quiral da chalcona **27**, do álcool racêmico **35** e do produto da reação de **BH 59**, as quais mostram que o tempo de retenção para cada composto é diferente, devido às suas diferentes polaridades.

Pela sobreposição dos cromatogramas da chalcona **27**, do álcool racêmico **35** e do produto de **BH 59** catalisado por **FP**, pode-se observar 3 picos com tempos de retenção distintos de aproximadamente 30,6, 17,2 e 19,8 minutos, respectivamente, comprovando que o produto de **BH** formado não é o álcool racêmico insaturado.

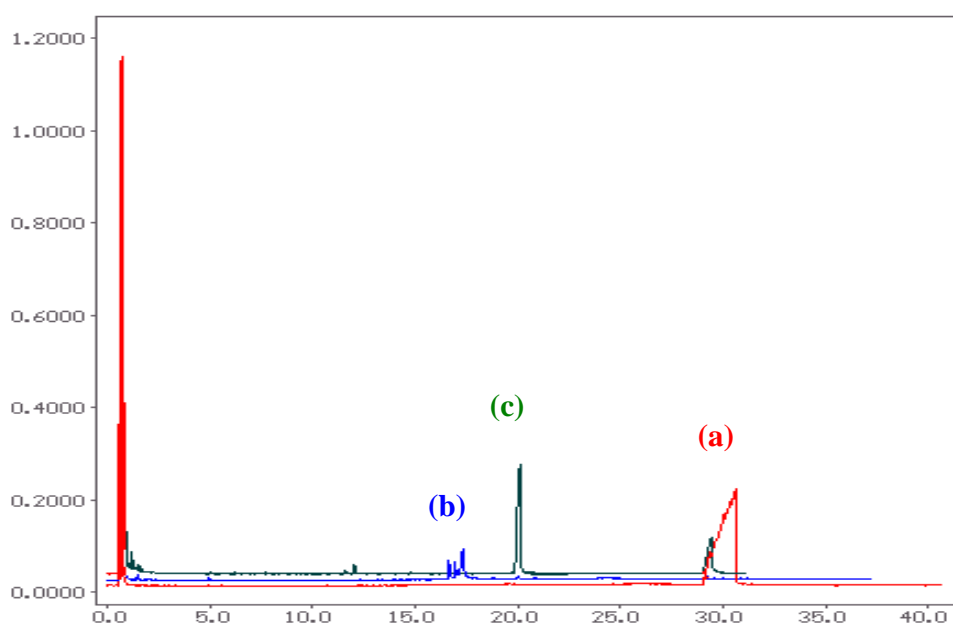


Figura 16. Sobreposição dos cromatogramas da chalcona **27** (a), do álcool racêmico **35** (b) e o produto da reação de **BH 59** (c), catalisada por **FP**. [condições operacionais: inj. = 250°C, Det. = 275°C, Ti = 100°C, Tf1 = 150°C, Tf2 = 200°C, Δaq.1 = 10°C/min, Δaq.2 = 5°C/min, pH2 = 75kPa]

Portanto, as análises de RMN-¹H e de CG-quiral evidenciam que ocorreu exclusivamente a redução da ligação dupla C=C, formando as correspondentes cetonas saturadas, denominadas **dehidrochalconas**, conforme exemplificado na **Figura 17**.

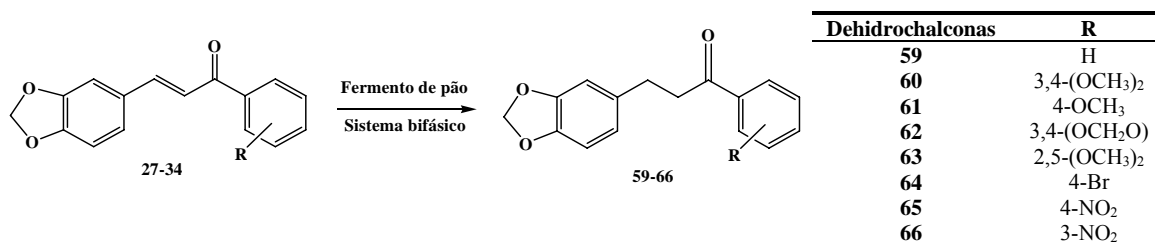


Figura 17. Reação de **BH** biocatalisada por **FP**, em **SB**.

5.3.1. Quantificação da reação de **BH** de 27-34 por RMN-¹H

As conversões de **27-34** às respectivas dehidrochalconas **59-66**, foram determinadas utilizando a técnica espectroscópica de RMN-¹H, pela comparação das áreas dos dois

tripletos centrados em 3,00-3,50 ppm, característicos aos quatro hidrogênios α,β à carbonila saturados, com a área dos dois dubletos centrados em 7,20-7,80 ppm ($J = 15,6$ Hz) referentes aos dois hidrogênios da $C=C \alpha,\beta$ -insaturada à carbonila.

A **Figura 18** mostra o espectro de RMN- 1H de uma alíquota da reação de **BH** da chalcona **27**, em sistema bifásico com tampão ácido cítrico/ K_2HPO_4 pH 4,5 em *n*-hexano, a 30 °C e 4 h de reação e com 6,0 g de **FP**. Neste estudo a conversão foi de 65%.

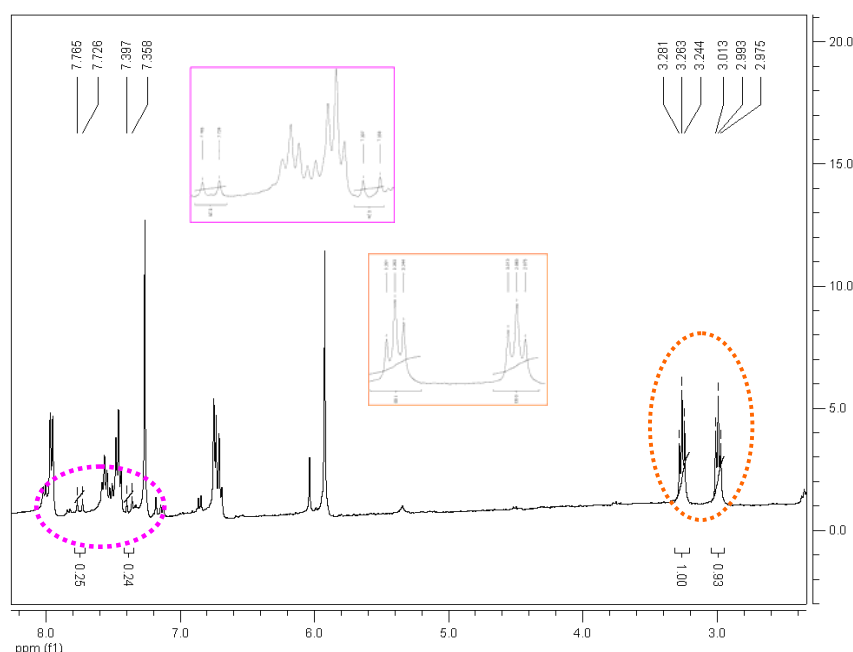


Figura 18. Espectro de RMN- 1H de uma alíquota da reação de **BH** da chalcona **27** catalisada por **FP**. Em destaque a ampliação das regiões de interesse, $CDCl_3$. (400 MHz)

A seguir serão apresentados os resultados obtidos da reação de **BH** das chalconas **27-34** mediada por fermento de pão em sistema bifásico ou em meio orgânico.

5.3.2. Influência do tempo de reação de **BH** de **27** com **FP** em sistema bifásico (**SB**)

Em uma primeira etapa, realizou-se o estudo da influência do tempo de reação na **BH** do (2*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona **27**, catalisada por 6 g de **FP** a 30 °C, em **SB** (pH 4,5). (**Figura 19**)

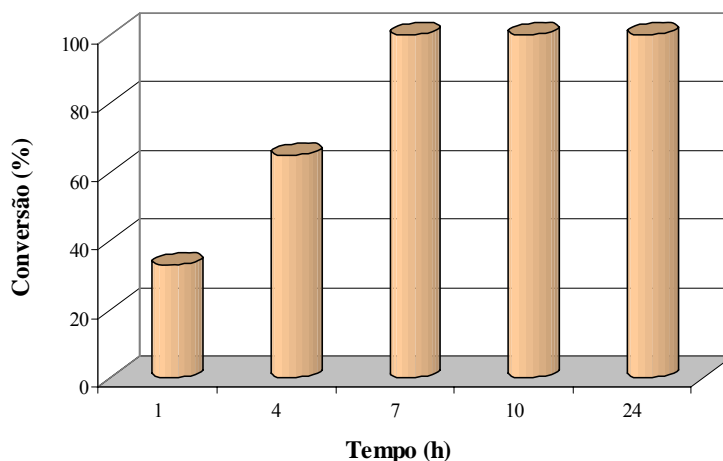


Figura 19. Influência do tempo de reação de **BH** de **27**. [252,1 mg (1 mmol) do substrato, 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K₂HPO₄ (0,1 M/0,2 M, pH 4,5); 6 g **FP**, 30°C]

É importante salientar que o pH 4,5³⁵ foi utilizado neste primeiro estudo por ter sido utilizado em estudos anteriores por Albuquerque (2007), na redução do acetoacetato de etila catalisada por diferentes cepas de *S. cerevisiae*.³⁶

Como pode ser observado na **Figura 19**, as conversões em (2*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-1-propanona (**59**) aumentaram de 33-99% com o aumento do tempo reacional até 7 h. Após este período, as conversões mantiveram-se constante, sendo >99%.

Um dado interessante que foi observado, é que no período investigado não houve a redução da carbonila, demonstrando assim a quimiosseletividade das enzimas envolvidas no processo.

A partir destes resultados, os estudos seguintes foram realizados em tempos reacionais de 4 h.

5.3.3. Influência da temperatura de reação de *BH* de **27**

Está bem documentado na literatura que as reações mediadas por enzimas ou microorganismos são influenciadas pela temperatura reacional, devido ao fato destas apresentarem alta sensibilidade perante temperaturas extremas.^{9,25,37}

A fim de avaliar a influência da temperatura do meio reacional, na reação de **BH** de **27**, mediada por **FP** em sistema bifásico, variou-se a temperatura de 25-50°C. Os resultados obtidos de conversão em **59** em função da temperatura estão apresentados na **Figura 20**.

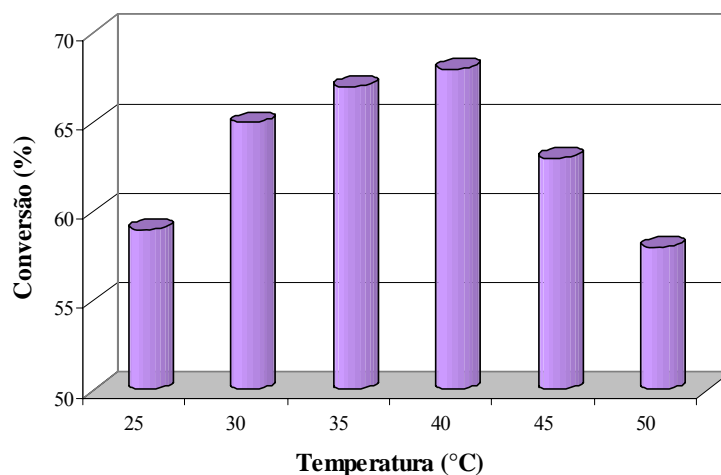


Figura 20. Influência da temperatura reacional da **BH** de **27**. [252,1 mg (1 mmol) do substrato; 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K₂HPO₄ (0,1 M/0,2 M, pH 4,5); 6 g de **FP**; 4 h.]

Na faixa de temperatura estudada, as conversões a dehidrochalcona **59** foram de 58-68%. As maiores conversões 67 e 68% foram obtidas a 35 e 40 °C, respectivamente.

Acima de 40 °C, as conversões em **59** diminuíram, conforme esperado, pois em temperaturas elevadas pode ocorrer a desnaturação ou diminuição da atividade catalítica das enzimas presentes no **FP**. Resultados similares foram obtidos por Li *et. al.* (2007), onde ao investigarem a redução da 2-octanona utilizando **FP** FD-12, verificaram um aumento na conversão com o aumento na temperatura de 28-32°C, e a partir desta temperatura ocorreu um decréscimo na conversão.³⁷

Outro fator que influencia na escolha da temperatura de reação é a possibilidade de evaporação do solvente orgânico. Considerando estes fatores, fez-se a escolha pela temperatura de 35 °C para os estudos subsequentes.

5.3.4. Influência do solvente orgânico no SB na reação de BH de 27

O log P, definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água, é o parâmetro mais frequentemente utilizado para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas. Segundo Laane *et. al.* (1987), os solventes que possuem $\log P \leq 2$ são hidrofílicos, não sendo adequados para biocatálise pois alteram fortemente a interação água/biocatalisador, tornando-o inativo ou ocasionando a desnaturação. Os solventes com log P entre 2 e 4 são também hidrofílicos, mas perturbam menos a interação água/biocatalisador. Os solventes com log P acima de 4 são hidrofóbicos, não alteram estas interações e deixam o biocatalisador no seu estado ativo.^{19,38,39}

Para verificar a influência do solvente orgânico na reação de **BH** de **27** mediada por **FP** em sistema bifásico, foram utilizados solventes orgânicos de diversas polaridades. Este estudo foi realizado a 35 °C, por um período de 4 h. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Influência do solvente orgânico em **SB** da reação de **BH** de **27**.

Solvente	log P _{oct} ^(a)	Conversão (%)
heptano	4,00	67
hexano	3,50	67
CCl ₄	3,00	38
tolueno	2,50	33
éter diisopropílico	1,90	47
diclorometano	1,50	<1
<i>n</i> -butanol	0,80	<1
<i>i</i> -propanol	0,38	<1
acetonitrila	-0,33	<1

[252,1 mg (1 mmol) do substrato; 30 mL de solvente orgânico, 30 mL de tampão ácido cítrico/K₂HPO₄ (0,1 M/0,2 M, pH 4,5); 6 g de **FP**; 4 h.] ^(a) logaritmo do coeficiente de partição octanol/água.³⁸

Os resultados obtidos neste trabalho, em geral, corroboram com os de Laane *et. al.*, mostrando que a conversão a produto foi dependente do solvente orgânico. Ao utilizar os solventes com log P > 2,50, foram obtidas as maiores conversões sendo de 33-67%, enquanto que com os solventes com log P < 1,90 não houve formação do produto. Neste estudo, a única exceção foi com o uso do éter diisopropílico, onde se obteve o produto com 47%.

A baixa conversão em **59** nos solventes mais polares deve-se provavelmente ao fato destes retirarem a camada de água essencial ao redor da enzima, causando distorção na conformação nativa e, portanto, alterando a atividade catalítica do biocatalisador.^{38,39}

Considerando os valores de conversão, solubilidade do substrato, inflamabilidade e toxicidade do solvente orgânico, o *n*-hexano foi escolhido como solvente para os estudos subsequentes.

5.3.5. Influência do pH do SB da reação de BH de 27

Cada enzima apresenta um pH ótimo na qual sua atividade é máxima.^{8,9} Uma pequena variação no pH pode afetar a conformação do sítio catalítico da enzima, devido ao fato de ocorrerem repulsões eletrostáticas na estrutura tridimensional e, como consequência, o rompimento das ligações de hidrogênio.^{8,37} Para verificar o efeito do pH na reação de **BH** de **27**, catalisada por **FP** em sistema bifásico com *n*-hexano, variou-se o pH da solução tampão de 3,5 a 8,8. Os resultados de bioconversão de **27** estão demonstrados na **Figura 21**.

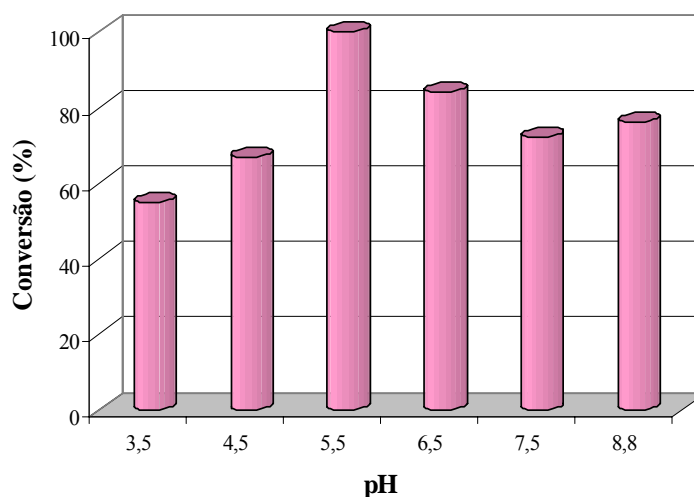


Figura 21. Influência do pH no SB de reação de **BH** de **27**. [252,1 mg (1 mmol) do substrato; 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K₂HPO₄ (0,1 M/0,2 M, pH 3,5-8,8); 6 g de **FP**; 35 °C; 4 h.]

Pode-se verificar uma dependência da bioconversão em relação ao pH da solução tampão do sistema bifásico. Com o aumento do pH de 3,5 a 5,5, as conversões em **59** aumentaram de 55-99%. Acima do pH de 5,5, houve uma diminuição nas conversões,

sendo de 99-72%. Pode-se observar, então, que em meios levemente ácidos há uma melhor atividade enzimática, sendo o pH ótimo em 5,5, neste caso. Resultados semelhantes foram descritos por Li *et. al.*, na redução assimétrica de 2-octanona em **SB** mediada por **FP** FD-12. Os maiores rendimentos (~45%) foram obtidos em pHs entre 7,0 e 8,0, entretanto a enantiosseletividade foi afetada nesta faixa de pH e o correspondente álcool-(*S*) foi obtido com *e.e.* 90,3%.³⁷

A partir destes resultados e para os estudos subsequentes utilizou-se o pH de 5,5, por este ter apresentado a maior conversão em **59**, sendo >99%.

5.3.6. Influência da massa de **FP** e do tempo da reação de **BH** de **27**

Após determinar as melhores condições para a reação de **BH** de **27**, fez-se o estudo da massa de **FP**, visando avaliar qual é a menor quantidade de biocatalisador que pode ser usado na obtenção do produto **59** com maior conversão. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 22**.

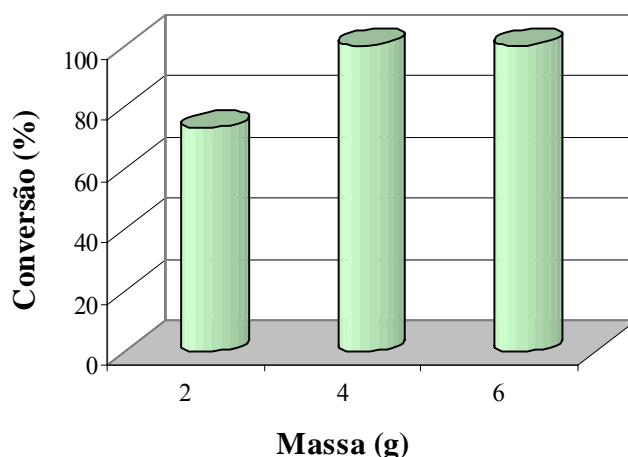


Figura 22. Influência da massa de biocatalisador. [252,1 mg (1 mmol) do substrato; 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K₂HPO₄ (0,1 M/0,2 M, pH 5,5); 2-6 g de **FP**; 35°C; 4 h.]

Observa-se que com o aumento da massa de biocatalisador de 2 a 4 g há um aumento nas conversões em **59** (73-99%) e acima de 4 g as conversões mantiveram-se constantes.

Portanto, não há necessidade de usar quantidades maiores de **FP**, implicando em redução de custos no processo.

Após verificar que é possível diminuir a massa de biocatalisador, sem perda nas conversões em produto, foi realizado um segundo estudo com relação ao tempo de reação, utilizando 4 g **FP** e em pH 5,5 a 35°C. (**Figura 23**)

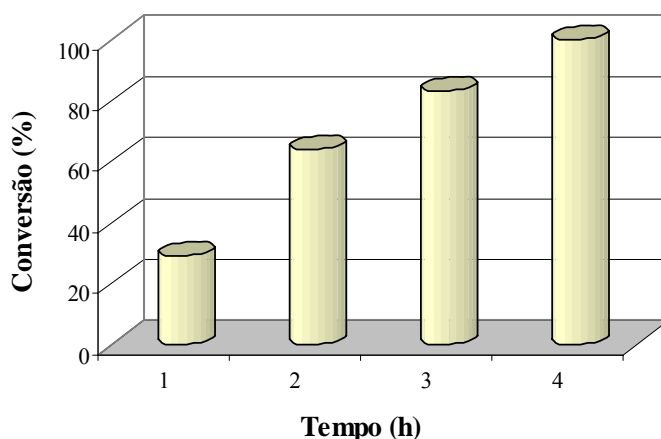


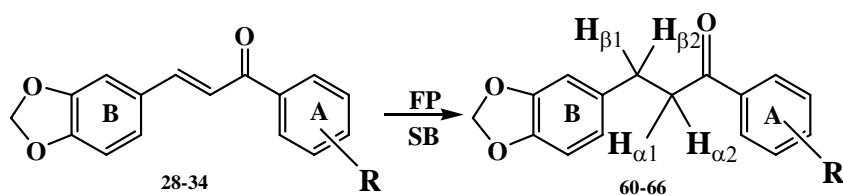
Figura 23. Influência do tempo de reação. [252,1 mg (1 mmol) do substrato; 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K₂HPO₄ (0,1 M/0,2 M, pH 5,5); 2-6 g de **FP**; 35°C; 1-4 h.]

Neste estudo foi observado que ocorreu um aumento nas conversões em **59** em função do tempo de reação, aumentando de 29-99% em um período de 1 a 4 horas. Estes resultados corroboram com o primeiro estudo de tempo, onde se utilizou uma maior massa de **FP**.

Após obter as melhores condições para a redução da chalcona **27**, realizaram-se os estudos referentes à influência de grupos substituintes no anel aromático **A** de **28-34** em 2 h de reação.

5.4. Influência de substituintes na BH de 28-34 com FP em SB

A partir das melhores condições da reação de **BH** da (2*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona **27** utilizando o fermento de pão para obtenção do 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propanona **59**, realizou-se o estudo de influência do substituinte no anel **A**, sendo estes doadores ou retiradores de elétrons.



As conversões obtidas para as bio-hidrogenações de **27-34** estão apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Influência dos substituintes no anel **A** na **BH** das chalconas **27-34**.

<i>Chalcona</i>	<i>Substituintes (R)</i>	<i>Conversão (%)</i> *
28	3,4-(OCH ₃) ₂	37
29	4-OCH ₃	26
30	3,4-(OCH ₂ O)	33
31	2,5-(OCH ₃) ₂	21
27	H	64
32	4-Br	14
33	4-NO ₂	33
34	3-NO ₂	35

[1 mmol do substrato **27-34**; 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de tampão ácido cítrico/K₂HPO₄ pH 5,5; 4 g de fermento de pão; 35 °C; 2 h]. *Para melhor solubilização de alguns substratos, fez-se necessária a adição de gotas de tetrahidrofurano (THF).

As reações de **BH** dos compostos **28-34** apresentaram baixas taxas de conversão em **60-66** (14-37%), quando comparados com a chalcona **27** (64%). Este resultado pode estar relacionado com inibição dos grupos substituinte doadores ou retiradores de elétrons nas diferentes etapas da reação. Deve-se considerar também que o **FP** contém um número grande de enzimas oxidorreduções e que estas podem ser afetadas de forma diferenciada para cada grupo substituinte.^{4,9} Outro fator que pode ser considerado, são os efeitos estéreos de cada grupo substituinte frente às enzimas, podendo inibi-las.⁴⁰ Resumindo, não houve grande diferença em relação à conversão ao analisar estes dois tipos de substituintes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ohta *et. al.* (1983), que observaram pouca influência dos efeitos eletrônicos na conversão de **BH** de chalconas substituídas por grupos doadores ou retiradores de elétrons nos anéis **A** e **B**.⁴⁰

5.5. Influência do suporte nas reações de BH de 27 com FP imobilizado

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos.¹⁹

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização.^{19,24}

Portanto, para verificar a estabilidade e manutenção de atividade catalítica do **FP**, este foi imobilizado em diversos suportes, sendo eles filmes poliméricos (PEO, PVA, CS e gelatina), cerâmica (mont K-10) e géis (Agar e gelatina), além do **SB**, como forma de comparação destes métodos de imobilização, com agitação em shaker orbital. A **Tabela 6** apresenta os valores de conversão obtidos da dehidrochalcona **59** com o FP imobilizado nos diversos suportes.

Tabela 6. Influência da imobilização do fermento de pão na BH de 27.

Sistema biocatalítico	Conversões (%)				
	1ª Utilização		2ª Utilização		1ª Utilização ^(a)
	4 h	24 h	48 h	48 h	48 h
FP/mont-K10	<1	-	7	-	-
FP/PEO/filme	<1	-	<1	-	-
FP/PVA/filme	<1	-	7	-	-
FP/CS/filme	<1	-	21	11	-
FP/G/filme	<1	-	17	9	-
FP/Agar/gel	29	46	47	8	42
FP/G/gel	<1	-	<1	-	36
FP/SB ^(b)	38	>99	>99	-	-

[126,1 mg (0,5 mmol) do substrato; 30 mL de *n*-hexano; 4 g de **FP** imobilizado; 35°C; agitação em shaker orbital]; ^(a) 25°C; ^(b) 30 mL de tampão ácido cítrico/K₂HPO₄ (0,1 M/0,2 M, pH 5,5) e 4 g de **FP** não imobilizado.

Observando as conversões de **27** nas reações que utilizam o fermento de pão imobilizado, é possível observar que a atividade catalítica deste microorganismo é bastante dependente da quantidade de água no meio. Na temperatura de 35 °C, os sistemas biocatalíticos que apresentaram as maiores conversões de **27** em **59**, foram **FP/G**, **FP/CS** e **FP/Agar**, sendo 17, 21 e 47%, respectivamente, após 48 horas de reação. Salienta-se que nos dois primeiros sistemas o **FP** foi imobilizado em filmes e no último na forma de gel, o qual apresenta maior quantidade de água (~15 mL).

Foi realizada também a reação utilizando o sistema **FP/G/gel** a 35 °C, mas não foram obtidas boas conversões pois o gel de gelatina derreteu a esta temperatura (a gelatina se dissolve em água quente a ~40 °C).⁴¹ Para contornar este problema, a reação foi repetida a 25 °C, optando-se utilizar também o sistema biocatalítico **FP/Agar/gel**. Nestas condições as conversões em **59** foram de 36 e 42% após 48 h.

Para verificar a manutenção da atividade catalítica dos suportes, fez-se a reutilização dos sistemas biocatalíticos **FP/CS/filme**, **FP/G/filme** e **FP/Agar/gel**. Os suportes foram reutilizados somente uma vez, pois o **FP** não manteve uma boa atividade catalítica. A conversão em **27** diminuiu consideravelmente ao utilizar o sistema **FP/Agar/gel**, sendo de 47 para 8%. Observa-se que este decréscimo foi menor para os demais filmes. Devido aos baixos valores de conversão em produto, optou-se por não mais reutilizá-los.

Conforme esperado, ao utilizar o **FP/SB**, que também é uma forma de imobilização, o produto foi obtido com maior conversão, >99% após 48 horas. No entanto, este sistema não possibilita a reutilização, o que aumenta os custos de produção.

Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos da literatura que citam a importância do meio aquoso ou de quantidades mínimas de água para manutenção da atividade catalítica do **FP**.^{20,25,36}

Outro aspecto interessante que pode ser verificado neste estudo é a importância da agitação na bioconversão em produto. Isto ficou evidenciado pela comparação da reação em **SB**. Houve uma grande diminuição de conversão em **59** quando se utilizou shaker orbital comparado com a reação em agitação mecânica, sendo 38 e 99, respectivamente, em 4 h.

Moreira e Nascimento (2007) e Cabral *et. al.* (2000), relatam que a agitação é importante para se obter uma melhor conversão em produtos. Com baixa taxa de agitação,

ocorre uma menor conversão em produtos devido a velocidade de transferência de massa ser baixa. No caso da reação com agitação mecânica, esta permite um controle mais adequado da velocidade de agitação, de forma a obter taxas de transferência de massa mais elevadas e, conseqüentemente, aumentado a conversão em produto.^{42,43}

Estas observações, aliadas ao fato de não haver uma barreira física entre o biocatalisador e o substrato, comprovam que a forma de imobilização mais eficiente para **BH** das chalconas **27-34** utilizando **FP** como biocatalisador, é o **sistema bifásico**.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados sobre a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalisador na redução das chalconas **27-34** em diferentes condições experimentais, serão descritas as principais conclusões.

- ✓ Todas as chalconas preparadas **27-34** foram obtidas com bons rendimentos, variando de 83,2 a 94,5% de acordo com o grupo substituinte;
- ✓ Todos os alcoóis racêmicos **35-42** foram obtidos com bons rendimentos (87,0-92,4%). A obtenção dos produtos racêmicos foi comprovada pela determinação do valor de α , sendo $\alpha_D = 0$;
- ✓ As chalconas **27-34** foram utilizadas nas reações de **BH** com **FP** comercial em sistema bifásico e/ou com **FP** imobilizado;
- ✓ Nestas reações, os produtos obtidos em todos os sistemas testados, foram as dehidrochalconas **59-66**;
- ✓ Foi avaliada a influência de diversos fatores na reação de **BH** de **27** e as melhores condições observadas são descritas a seguir:
 - Tempo: com o aumento do tempo de reação ocorreu o aumento da conversão até um máximo constante, sem formação de outro produto, sendo que acima de 7 h foi >99%;
 - Temperatura: a faixa de temperatura que apresentou maior conversão em produto foi de 35-40 °C, sendo de 58-68 %;
 - Solvente orgânico: os melhores solventes orgânicos no **SB** foram heptano (log P 4,00) e *n*-hexano (log P 3,50), com $c = 68\%$ para ambos;
 - pH do tampão do meio aquoso: na faixa de pH entre 5,5 e 6,5 houve a maior conversão em produto, sendo de >99 e 84%, respectivamente;
 - Massa do biocatalisador: em 4 h de reação é possível utilizar 4 g de **FP** sem perda da conversão em **59**, $c = 99\%$.

- ✓ Utilizando as melhores condições obtidas nos itens anteriores (35 °C, *n*-hexano, pH 5,5, 4 g **FP**, 2 h), realizaram-se os estudos de bio-hidrogenação de **28-34**, com grupos substituintes doadores e receptores de elétrons no anel aromático **A**. Não foram observados efeitos significativos nas conversões em função do substituinte, sendo estas menores quando comparadas com **27**, $c = 14-37\%$.
- ✓ Nos estudos de bioconversão **27**, com o **FP** imobilizado em diferentes suportes, os mais efetivos foram **FP/Agar/gel** (35 °C e 25 °C), **FP/G/gel** (25 °C) e **FP/SB** convertendo **27** a **59** em 47, 42, 36 e 99%, respectivamente.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os publicados na literatura, evidencia-se a eficiência deste método. Pode-se então concluir que a utilização de FP como biocatalisador na redução das chalconas **27-34**, é um método bastante eficiente, pois utilizam-se de condições relativamente brandas de reação (pH, temperatura, solvente pouco tóxico, agitação controlada), e os produtos foram obtidos com conversões de 0-99%.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, propõem-se como continuidade a este trabalho as seguintes etapas:

- ✓ Realizar a bio-hidrogenação de outros compostos de interesse (piperina, iminas), em sistema bifásico;
- ✓ Reutilizar os sistemas biocatalíticos com **FP** imobilizado em gel de Agar e gelatina, a 25 °C;
- ✓ Recobrir o sistema **FP/mont K-10** em diferentes tipos de géis para realizar outros estudos de bio-hidrogenação com as chalconas ou outros compostos de interesse;
- ✓ Testar outros microorganismos ou enzimas na bio-hidrogenação de compostos carbonílicos pró-quirais, importantes na construção de blocos químicos.

REFERÊNCIAS

1. Straathof, A. J.J.; Panke, S.; Schmidt, A., *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, 13, 548-556.
2. Seebach, D.; Sutter, M. A.; Weber, R. H. Bakers' yeast reduction of ethyl acetoacetate. In: ROBERTS, S. M. (Ed). *Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis*. Chicester: John Wiley & Sons, 1999.
3. <http://pt.wikipedia.org/wiki/P%C3%A3o>, acessada em 03/11/2008.
4. Pereira, R. de S., *Quim. Nova*, 1995,18(5), 452-459.
5. Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J., *Quim. Nova*, 2001, 24(6), 893-897.
6. Pilli, R. A., *Quim. Nova na Escola*, 2001, 14, 16-24.
7. Araque, E.; Parra, C.; Rodríguez, M.; Freer, J.; Baeza, J., 2008, *Enzyme Microb. Technol.*, 2008, 43(2), 120-123.
8. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3rd ed., Worth Publishers: New York, 2000.
9. Faber, K.; *Biotransformation in Organic Chemistry.*, Springer-Verlag: Berlin, 1997.
10. Uieara, M., *Química Orgânica Biológica*, UFSC, 2001.
11. Campbell, M. K., “*Biochemistry*”, 2nd Ed., Saunders College Publication, 1995.
12. Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*, 2nd Ed., John Wiley & Sons inc., New York, 1994.
13. <http://www.rcsb.org/pdb>, acessada em 05/11/2008.
14. Chu, Y.; Zhang, B. L.; Silvestre, V.; Cheng, J. P., *Bioorg. Chem.*, **2006**, 34, 158-166.
15. Assunção, J. C. C.; Machado, L. L.; Lemos, T. L. G.; Cordell, G. A.; Monte, F. J. Q., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2008**, 52-53, 194-198
16. Perles, C. E.; Moran, P. J. S.; Volpe, P. L. O., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2008**, 52-53, 82-87.
17. Wolfson, A.; Dlugy, C.; Blumenfeld, J.; Shotland, Y., T., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 2043-2045.
18. Dumanski, P. G.; Florey, P.; Knetting, M.; Smallridge, A. J.; Trehwella, M. A. , *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, 11, 905-908.

19. Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Nascimento, M. G.; Soldi, V., *Process. Biochem.*, **2005**, 40, 2677-2682.
20. Albuquerque, P. M.; Witt, M. A.; Stambuk, B. U.; Nascimento, M.G., *Process. Biochem.*, **2007**, 42, 141-147.
21. Stambuk, B. U.; Panek, A. D.; Crowe, J. H.; Araujo, P. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1379, 118-128.
22. Dong, Y.; Yang, Q.; Jia, S.; Qiao, C.; *Biochem. Eng. J.*, **2007**, 37, 226-230.
23. Moreira, M. A.; Bitencourt, T. B.; Nascimento, M. G., *Synth. Commun.*, **2005**, 5, 2107-2114.
24. Sebrão, D.; Silva, V. D.; Nascimento, M. G.; Moreira, M. A., *Quim. Nova*, **2007**, 30(5), 1182-1187.
25. Nascimento, M. G.; Zanotto, S. P.; Melegari, S. P., *Quim. Nova*, **2002**, 25(4), 567-571.
26. Xiao, M. T.; Huang, Y. Y.; Ye, J.; Guo, Y. H., *Biochem. Eng. J.*, **2008**, 39, 311-318.
27. Spie, A. C.; Eberhard, W.; Peters, M.; Eckstein, M. F.; Greiner, L.; Buchs, J., *Chem. Eng. Process.*, **2007**, 47, 1034-1041.
28. Lahtchev, K.L.; Batovska, D.I.; Parushev, St.P.; Ubiyvovk, V.M.; Sibirny, A.A., *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, doi 10.1016/j.ejmech.2007.12.027
29. Petrov, O.; Ivanova, Y.; Gerova, M., *Catal. Comun.*, **2008**, 9, 315-316.
30. Suryawanshi, S.N.; Chandra, N.; Kumar, P; Porwal, J.; Gupta, S., *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 2473-2478.
31. Costa, P.; Pili, R., Pinheiro, S.; Vasconcellos, M., *Substâncias Carboniladas e Derivados*, Porto Alegre:Brookman, 2003.
32. Clososki, G. C.; Milagre, C. D. F.; Moran, P. J. S.; Rodrigues, J. A. R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2007**, 48, 70-76.
33. <http://chemfinder.cambridgesoft.com/>, acessada em 07/11/2008.
34. Williams, D.H.; Fleming, I.; *Spectroscopic methods in organic chemistry*; 4th ed., McGraw Hill, 1987.
35. Morita, T. Assumpção. R. V.; *Manual de soluções, Reagentes e Solventes.*; Editora Edgard Blücher Ltda. 2ª edição, **1995**.

36. Albuquerque, P. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2007.
37. Li, Y. N.; Shi, X. A.; Zong, M. H.; Meng, C.; Dong, Y. Q.; Guo, Y. H., *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, 40, 1305-1311.
38. Laane, C.; Boeren, C.; Veger, C., *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 30, 81.
39. Bie, S.; Lu, F.; Du, L.; Qiu, Q.; Zhang, Y., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2008**, 55, 1-5.
40. Ohta, H.; Konishi, J.; Tsuchihashi, G. I., *Chem. Lett.*, **1983**, 1895-1896.
41. Clark, A. H.; Ross-Murohy, S. B.; *Adv. Polymer Sci.*, 83, 107-115, **1987**
42. Moreira, M. A.; Nascimento, M. G., *Catal. Comun.*, **2007**, 8, 2043-2047.
43. Oliveira, C.; Rosa, M. F.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S., *Enzyme Microb. Technol.*, **2000**, 26, 446-450.

ANEXO 1

Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e de absorção no IV (pastilha de KBr) das chalconas **27-34**.

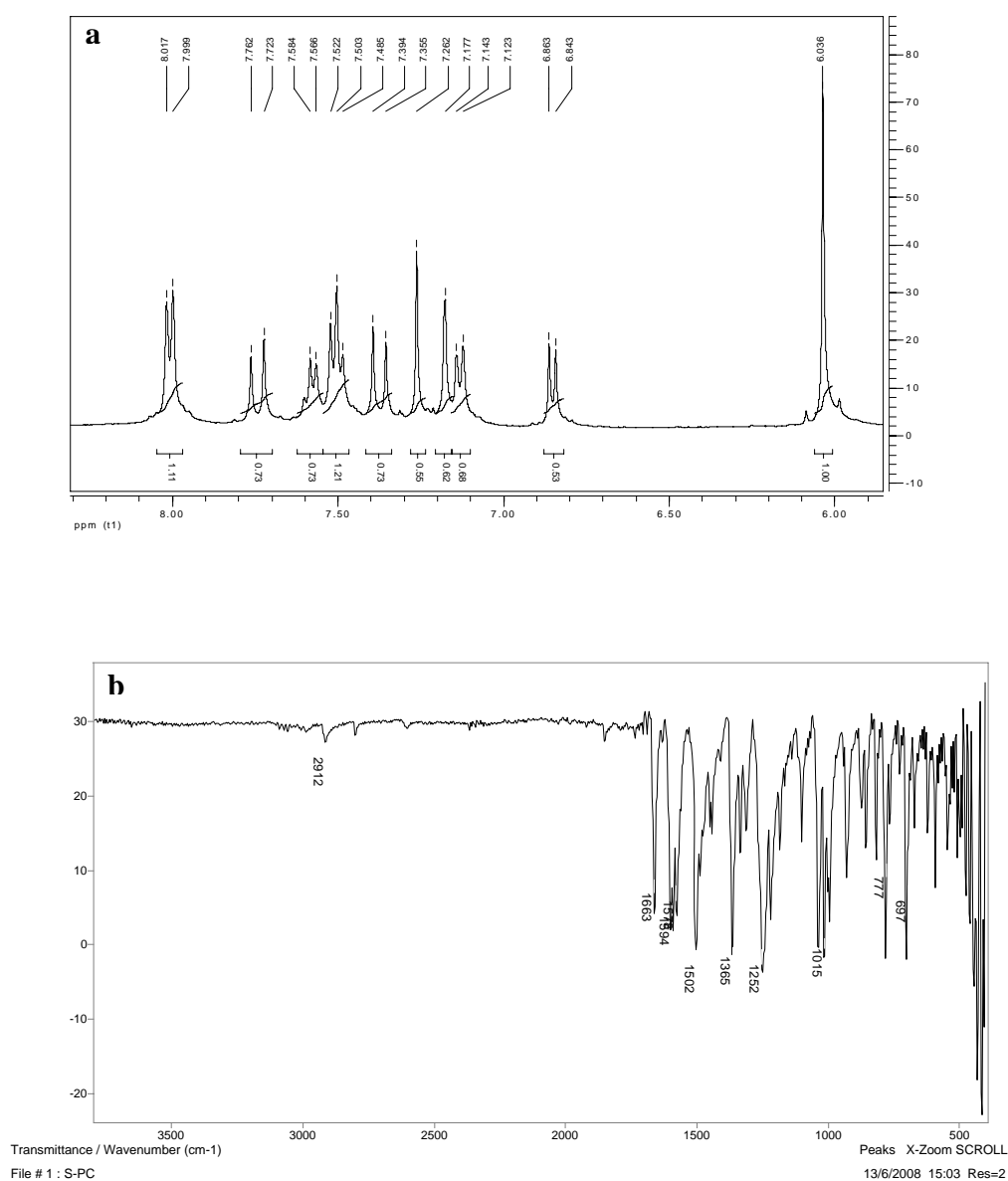


Figura 24. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona **27**.

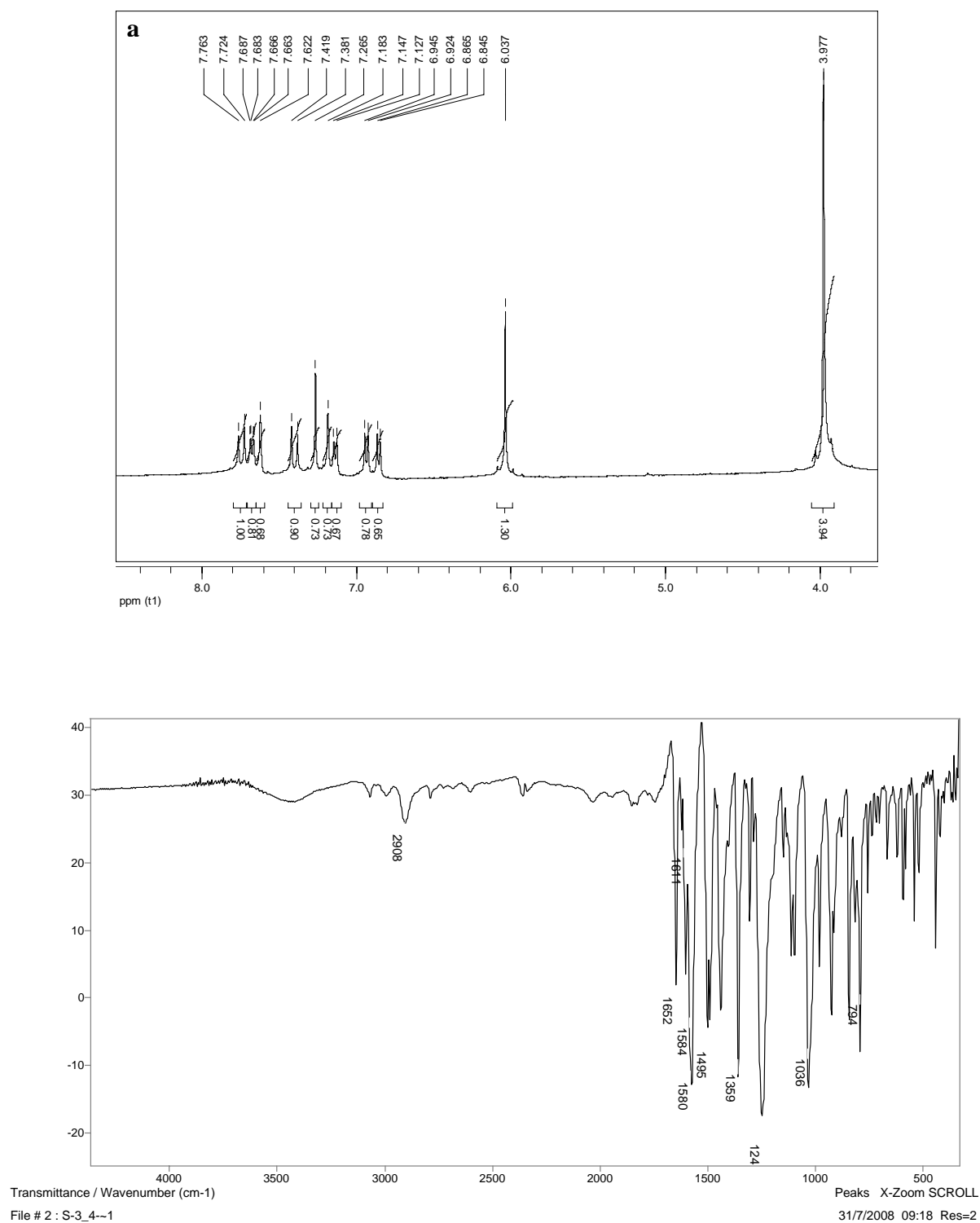
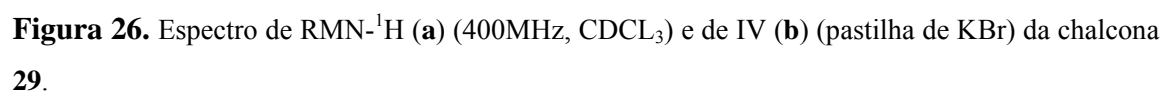


Figura 25. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 28.



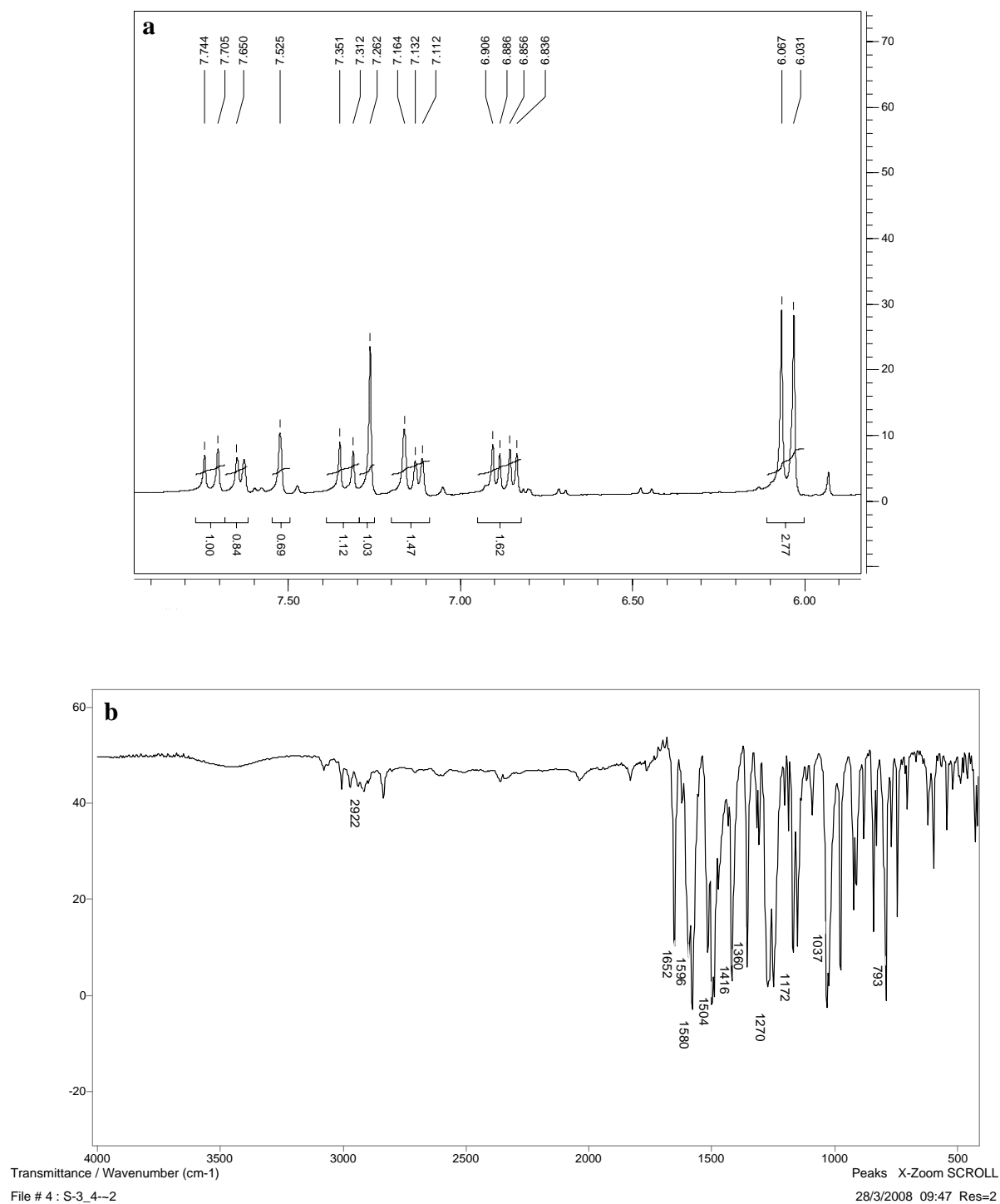


Figura 27. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 30.

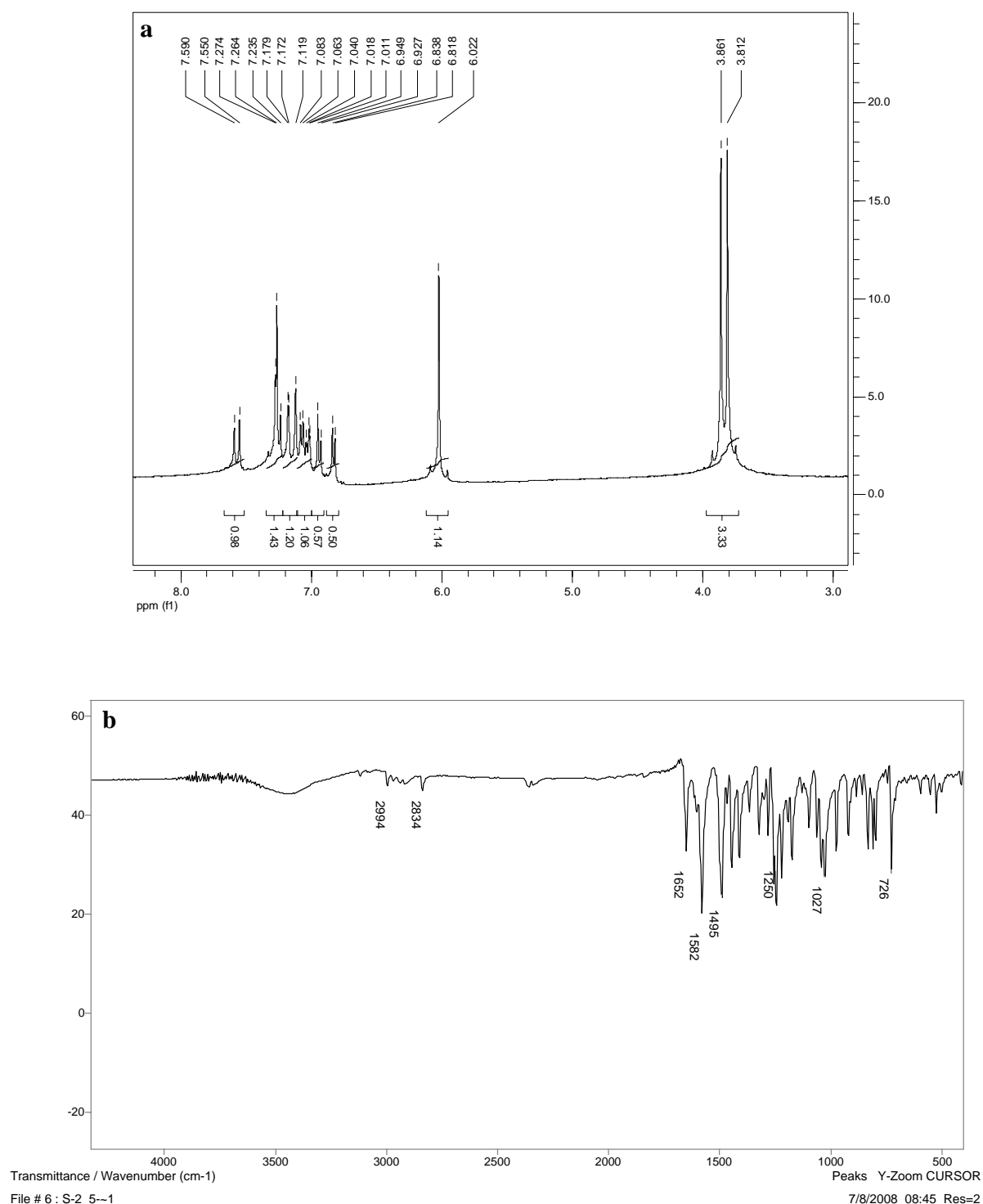


Figura 28. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 31.

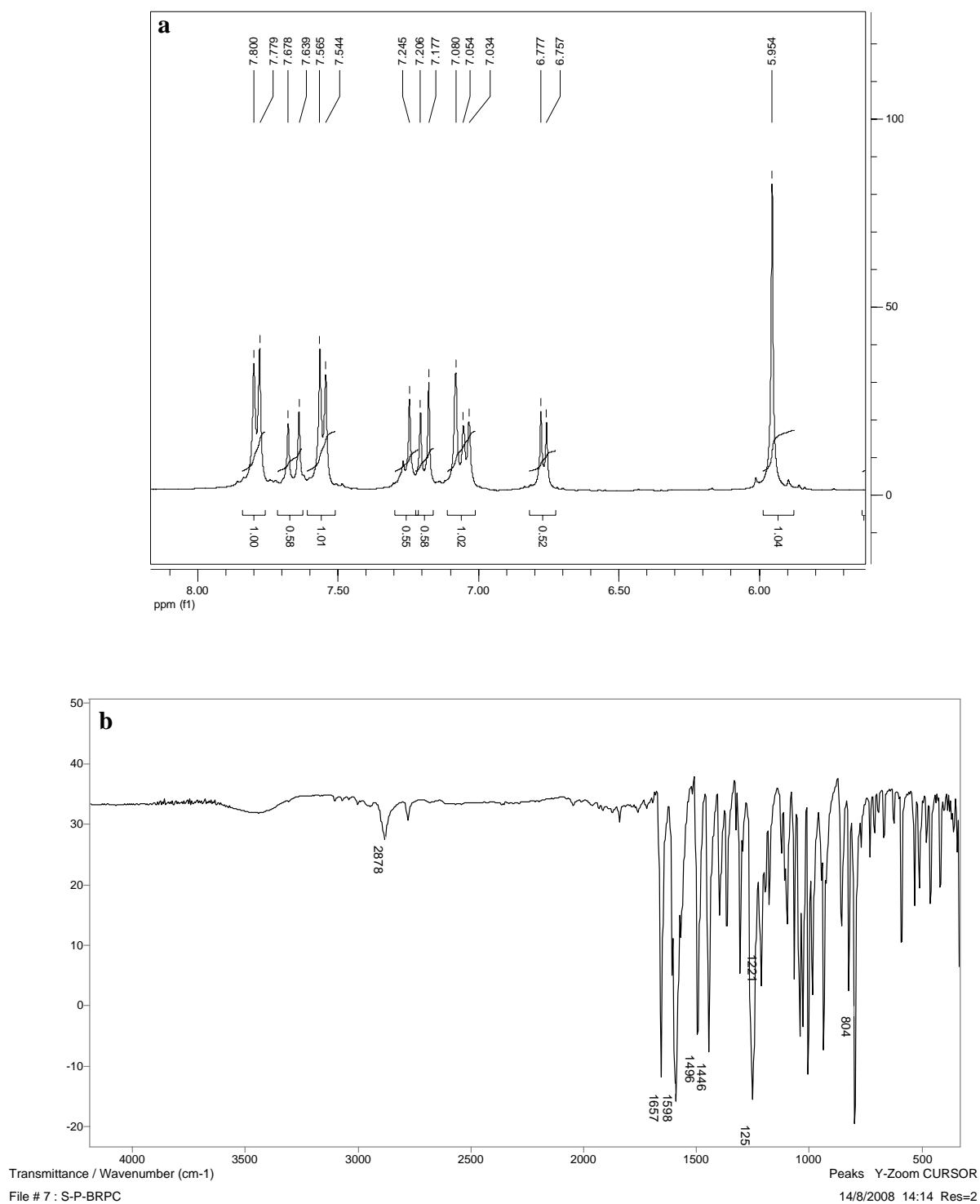


Figura 29. Espectro de RMN- ^1H (**a**) (400MHz, CDCl_3) e de IV (**b**) (pastilha de KBr) da chalcona 32.

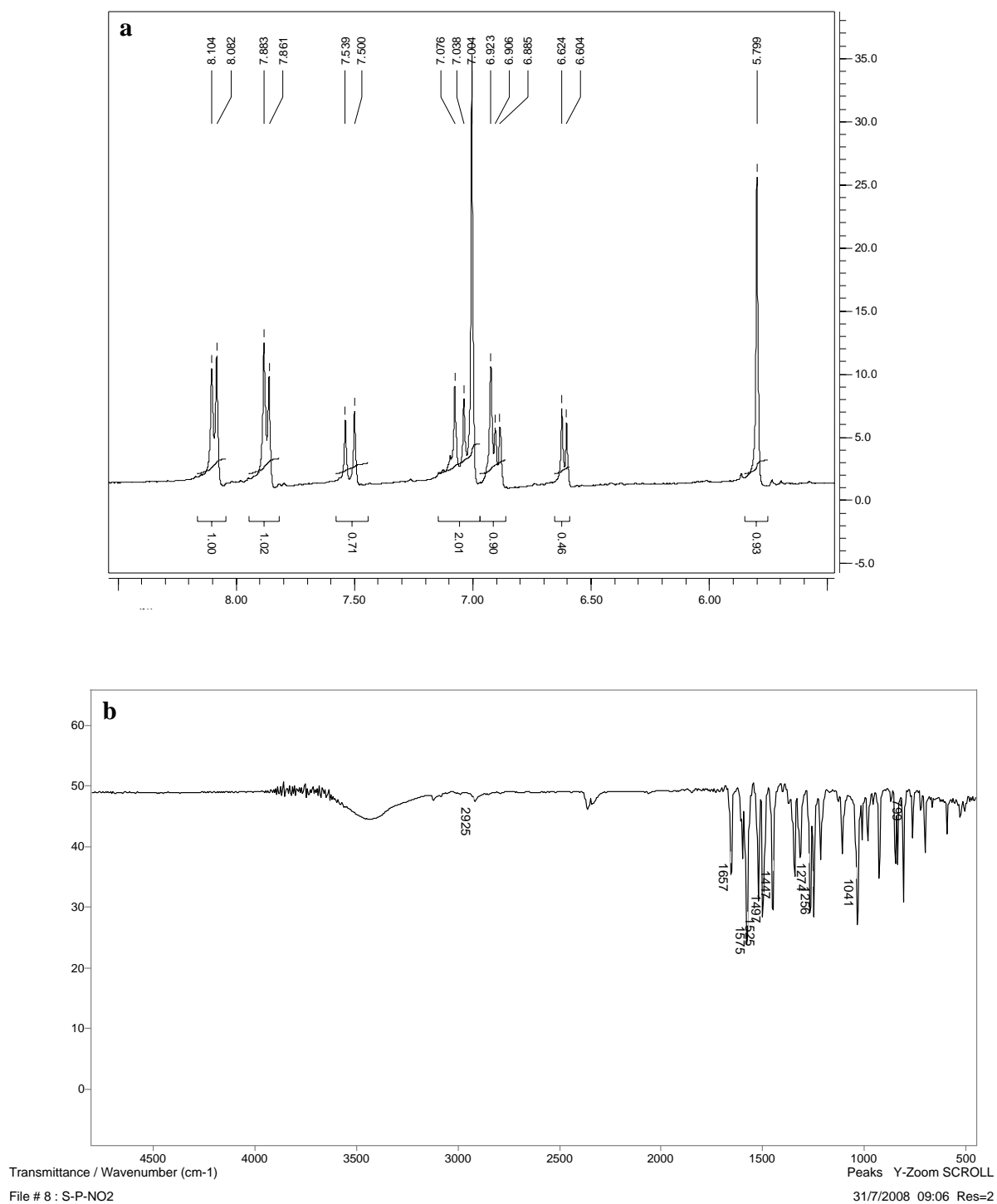


Figura 30. Espectro de RMN-¹H **(a)** (400MHz, CDCl₃) e de IV **(b)** (pastilha de KBr) da chalcona 33.

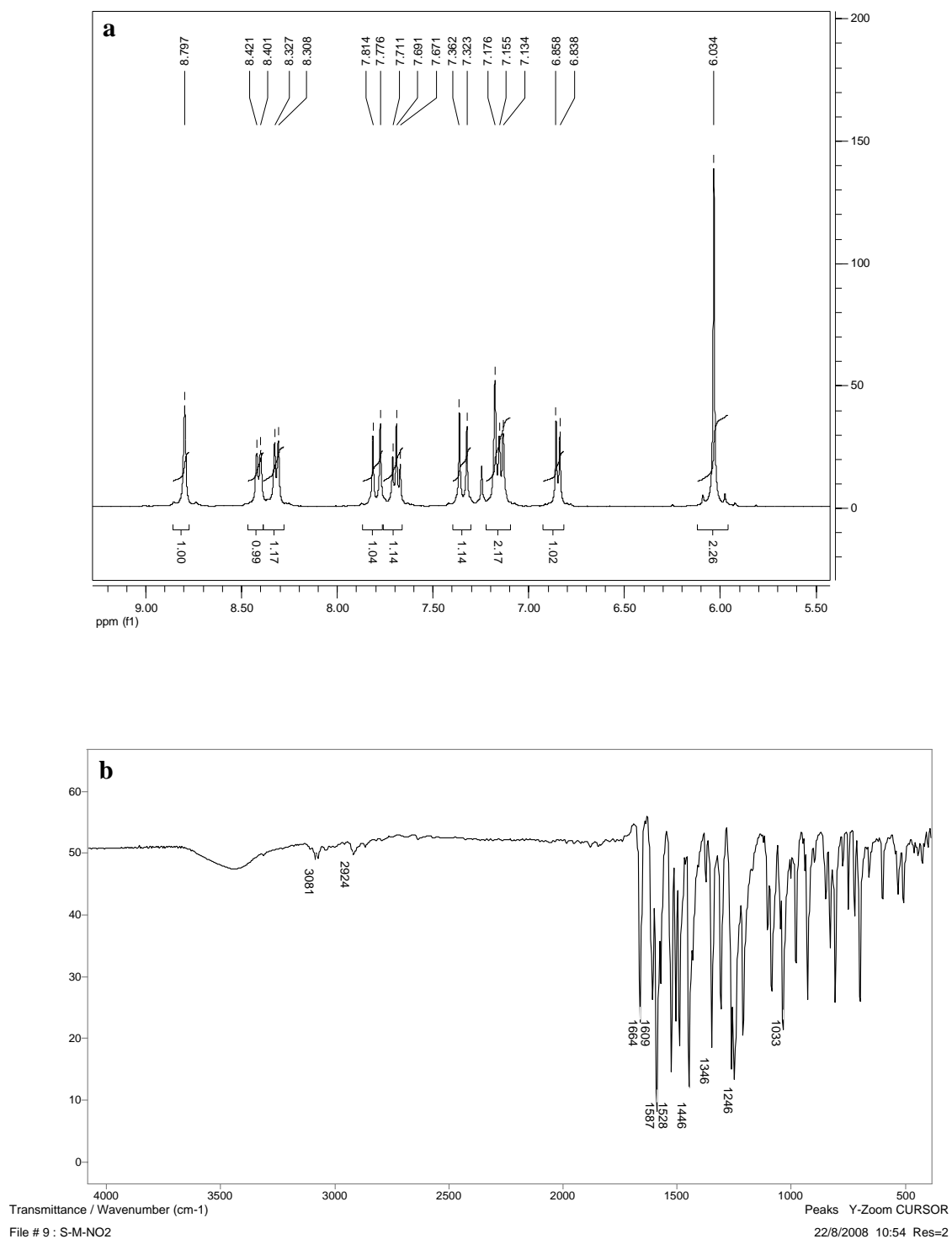


Figura 31. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) da chalcona 34.

Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e de absorção no IV (filme) dos alcoóis racêmicos **35-42**.

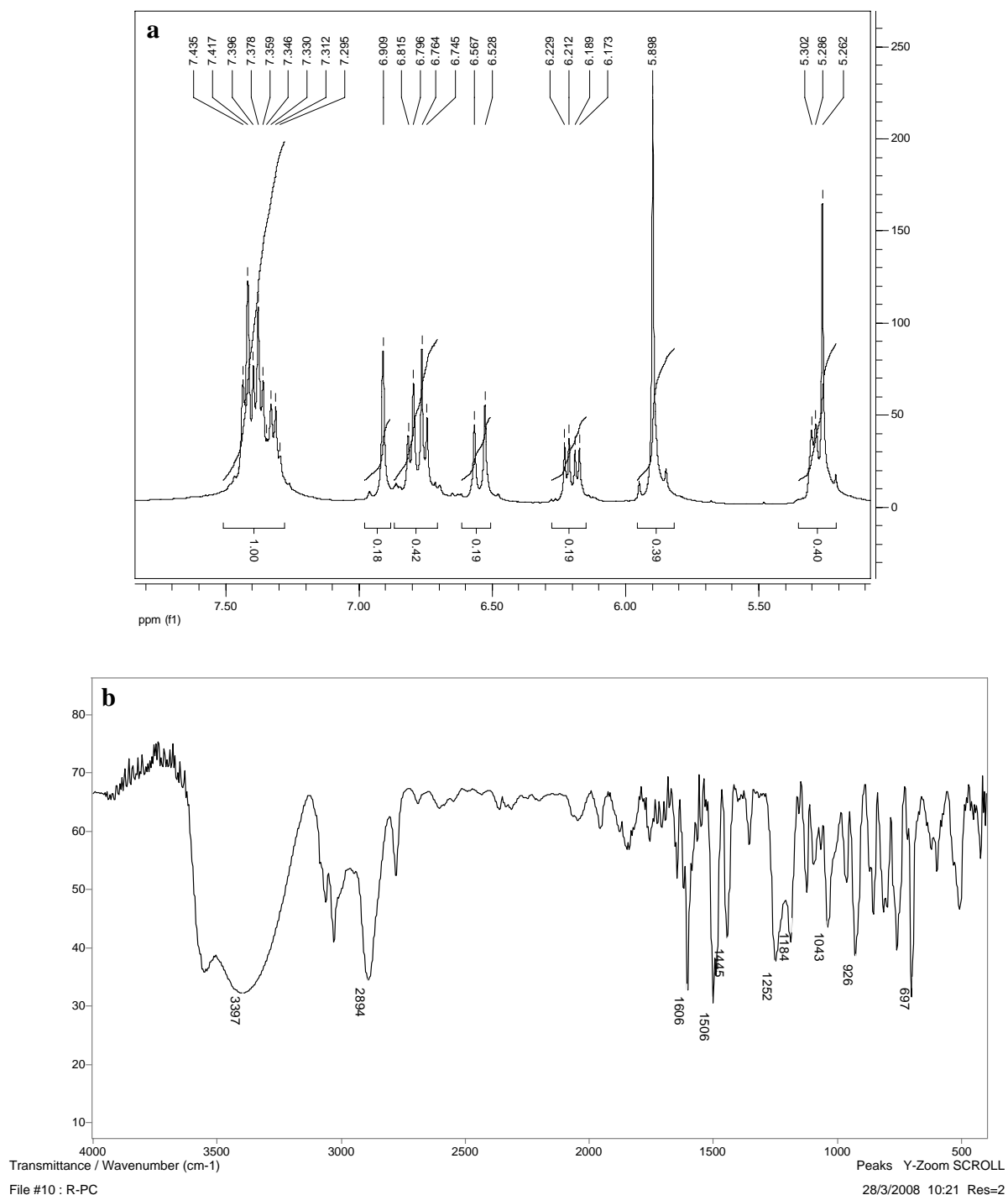


Figura 32. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico **35**.

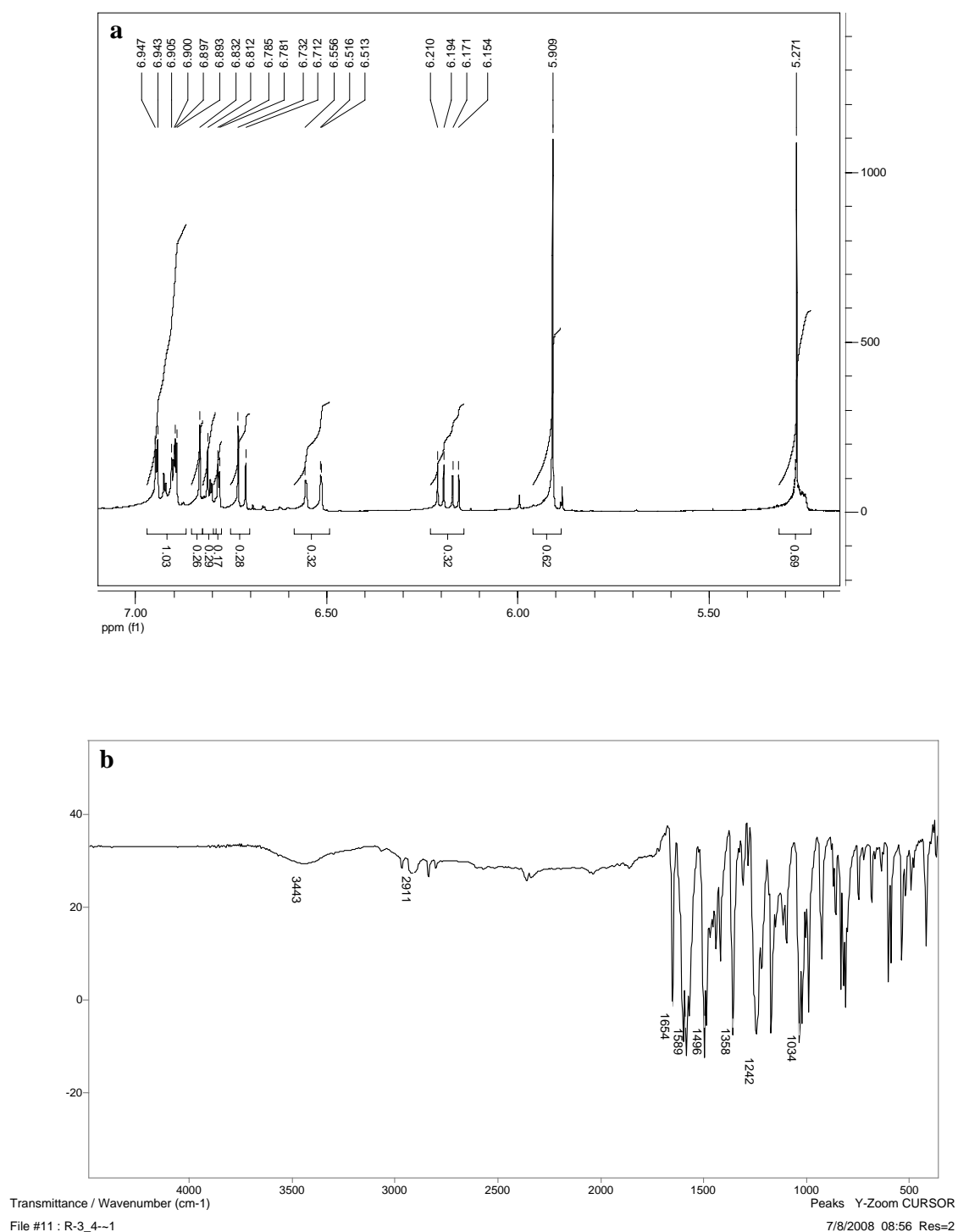


Figura 33. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico **36**.

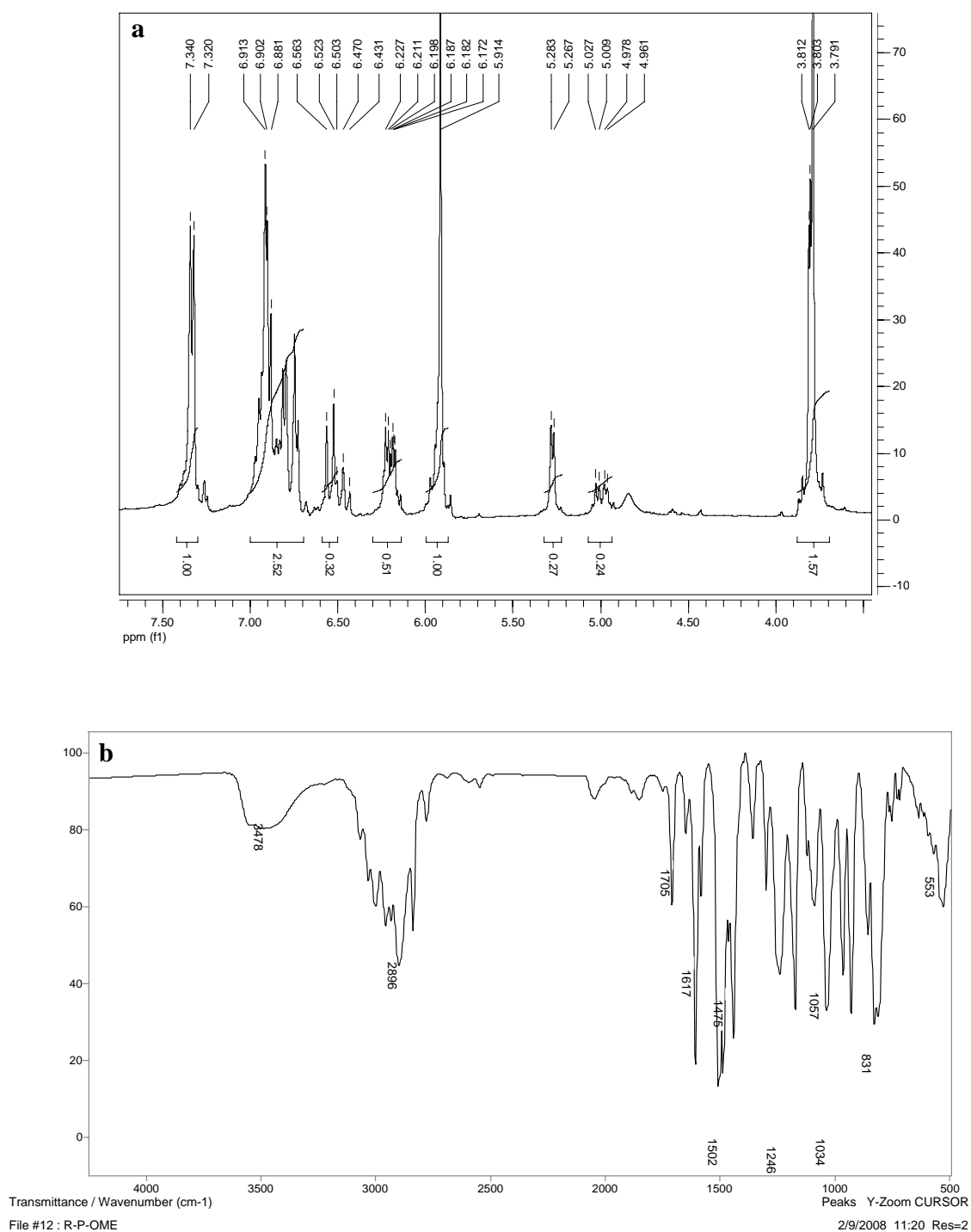


Figura 34. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico **37**.

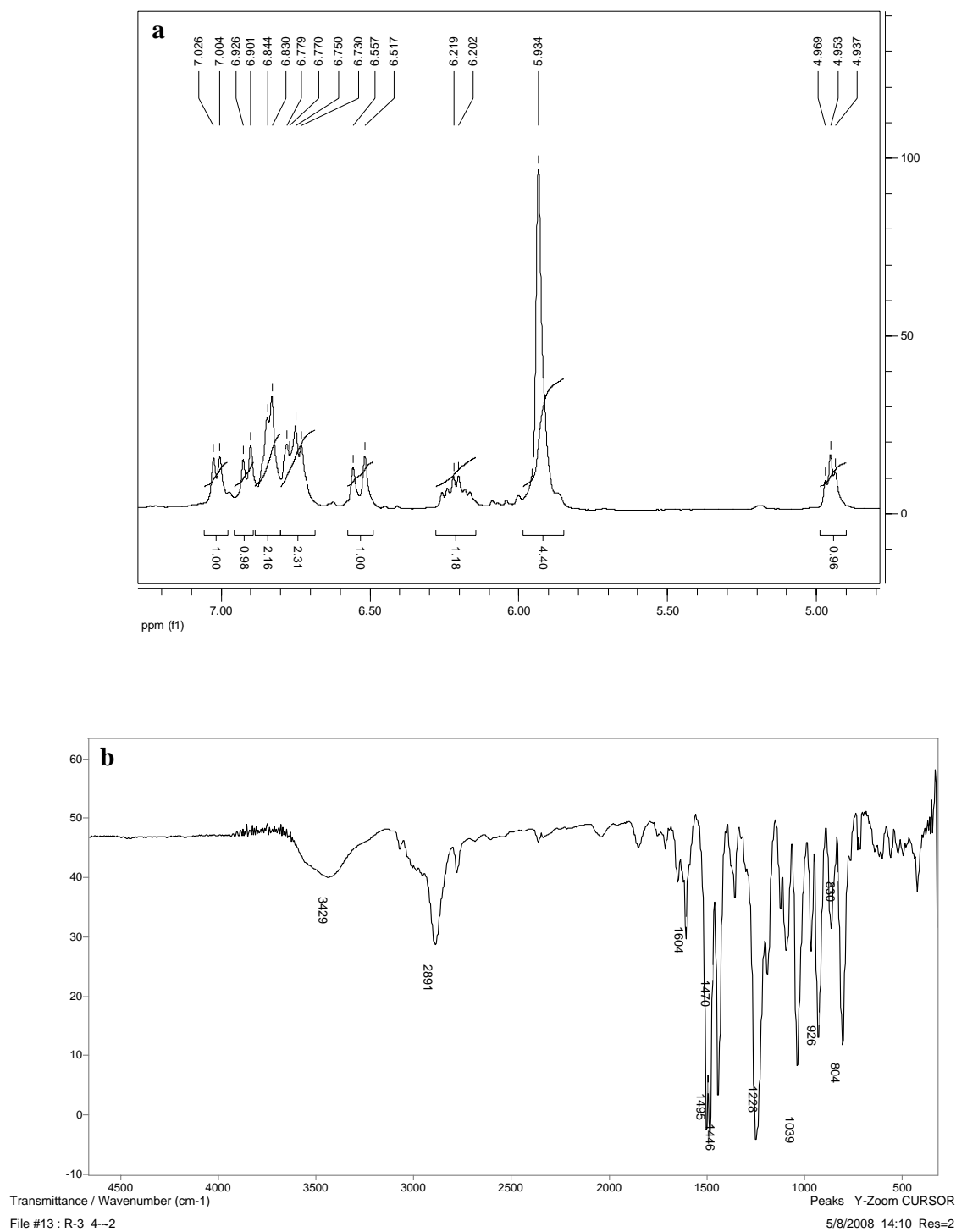


Figura 35. Espectro de RMN-¹H (a) (400MHz, CDCl₃) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico **38**.

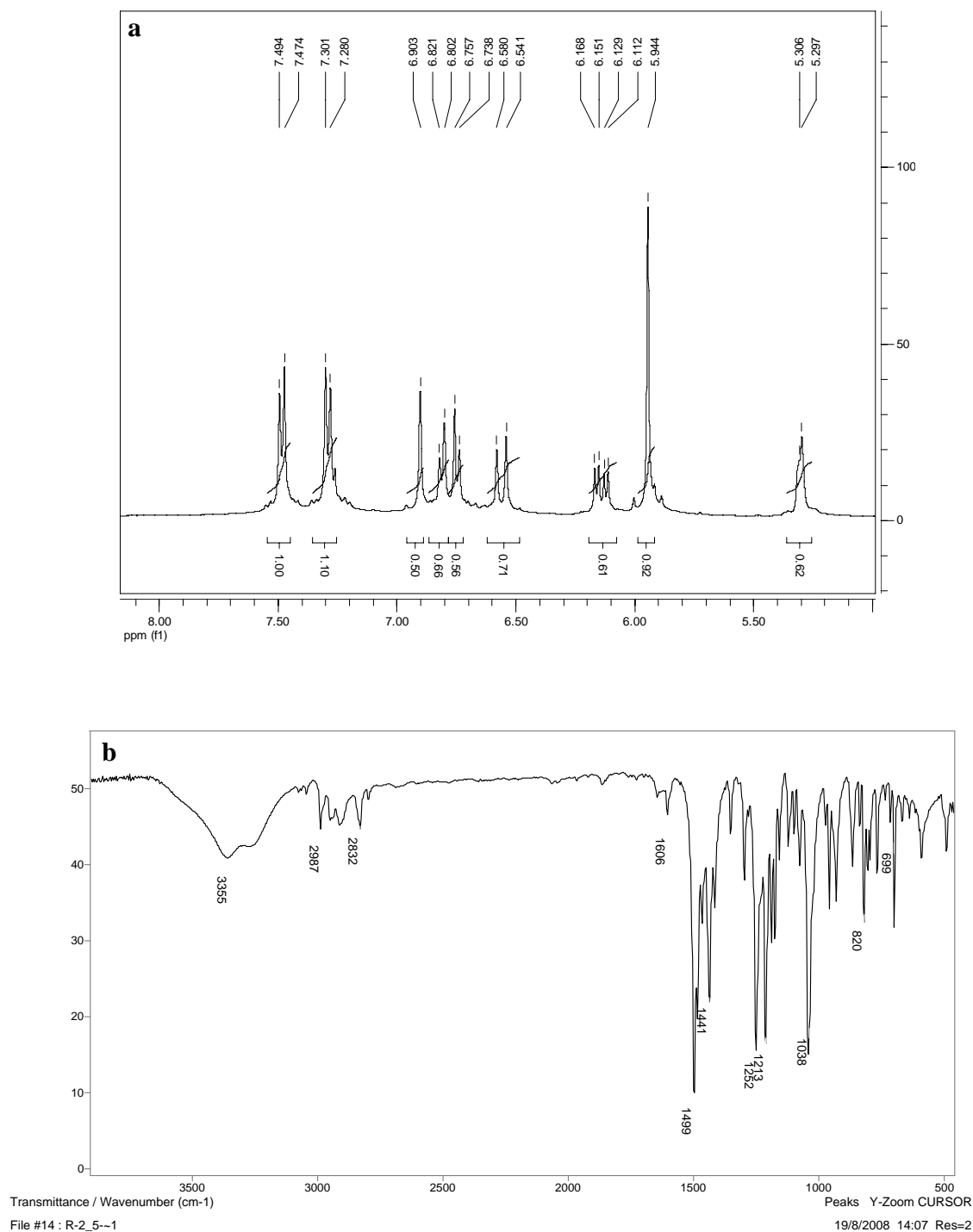


Figura 36. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico **39**.

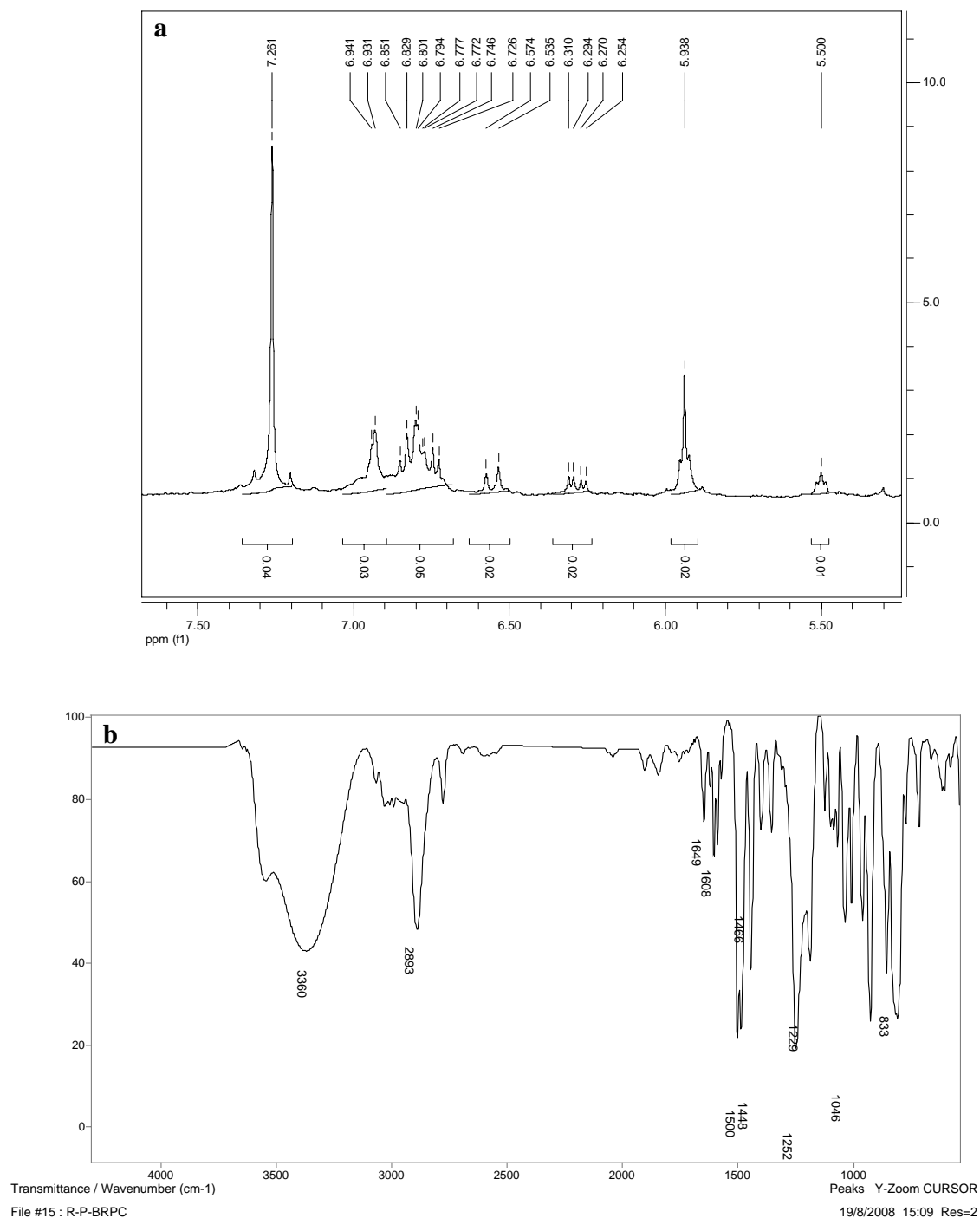


Figura 37. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico **40**.

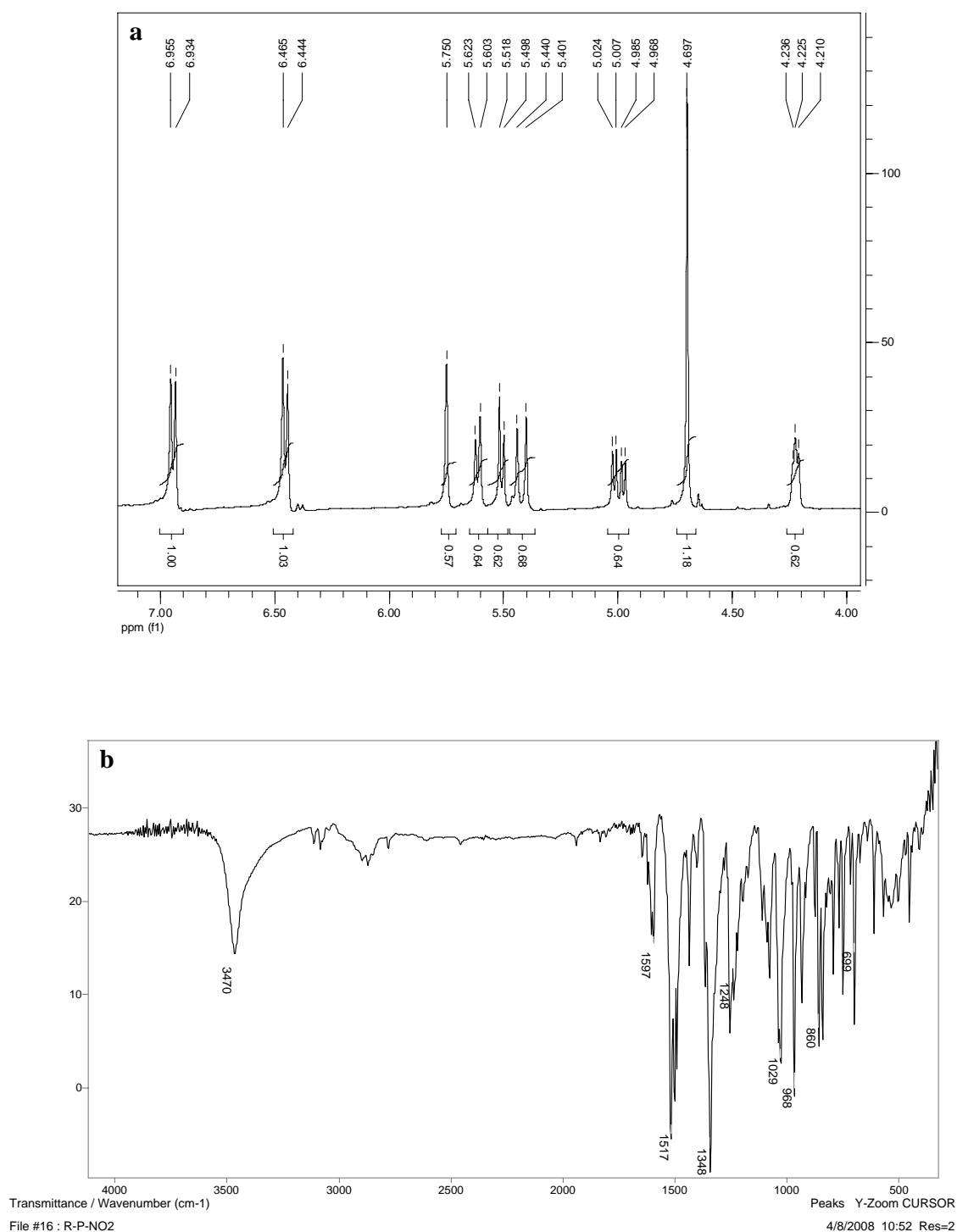


Figura 38. Espectro de RMN- ^1H (**a**) (400MHz, CDCl_3) e de IV (**b**) (pastilha de KBr) do álcool racêmico **41**.

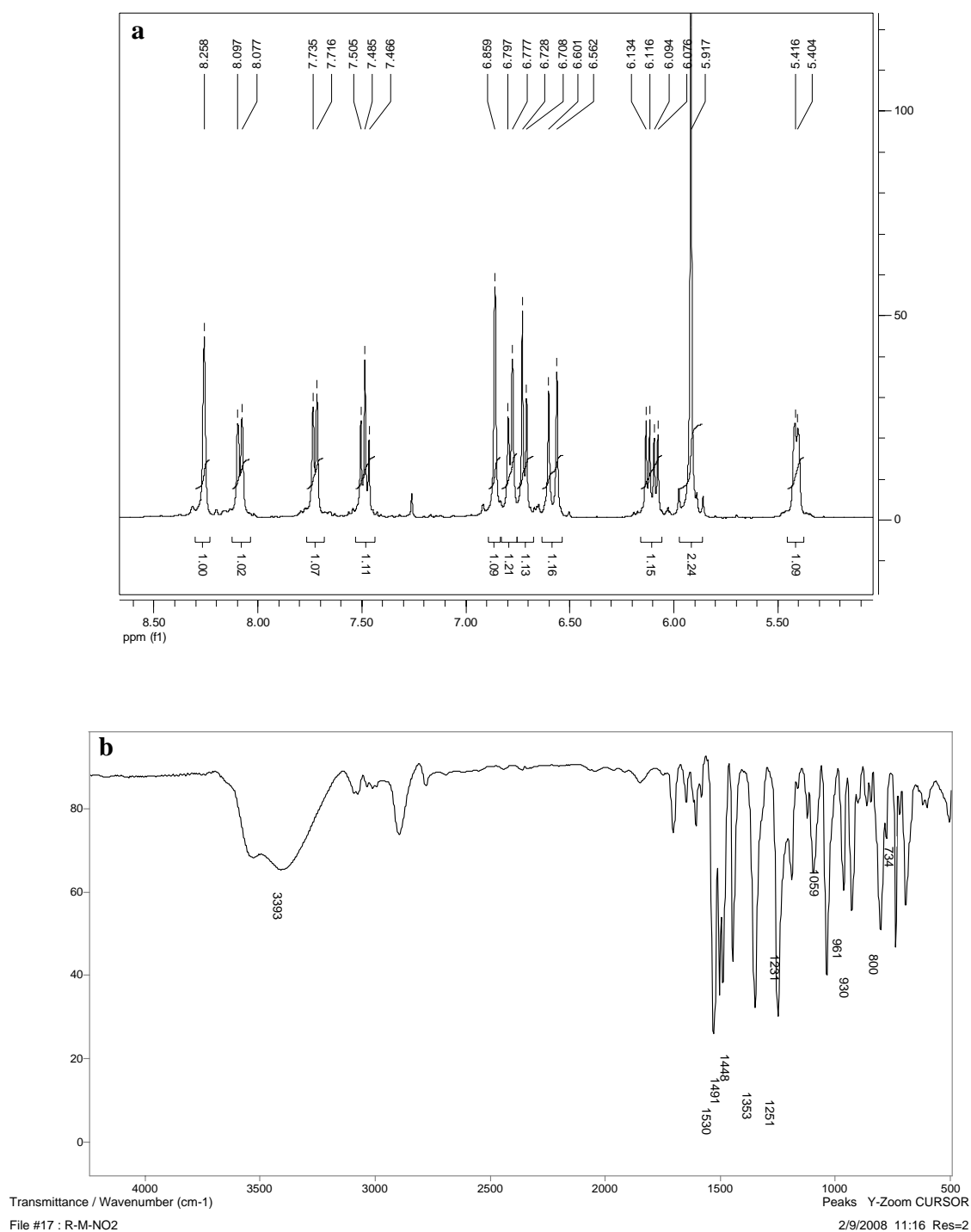


Figura 39. Espectro de RMN- ^1H (a) (400MHz, CDCl_3) e de IV (b) (pastilha de KBr) do álcool racêmico 42.

ANEXO 2

Como resultado dos trabalhos desenvolvidos até presente data, foram apresentados 2 (dois) trabalhos no XVI Encontro de Química da Região Sul (13 a 15 de Novembro de 2008, Blumenau-SC).

As cópias dos mesmos estão anexadas, a seguir.

Preparação e caracterização de chalconas derivadas do piperonal e dos alcoóis racêmicos

Flávia Luiza de S. Mundstock* (IC)¹, Vanessa D. Silva (PG)¹, Maria da Graça Nascimento (PQ)¹

Tel./Fax: +55-48-37219968; * mundstock@qmc.ufsc.br

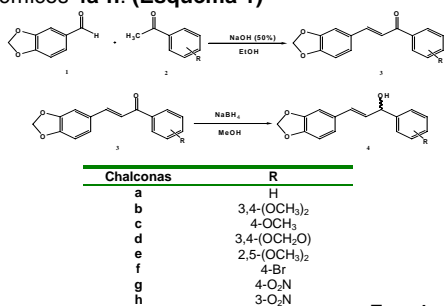
¹Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Química – Florianópolis, SC – 88040-900.

Palavras Chave: chalconas, condensação aldólica básica, redução.

Introdução

1,3-diaril-2-propen-1-onas (chalconas) e seus derivados pertencem à família dos flavonóides, e podem ser obtidas naturalmente ou sinteticamente. O interesse por estes compostos vem crescendo continuamente, devido as suas numerosas aplicações farmacológicas, tais como, antiinflamatório, antifúngica e anti-hiperglicêmicas.^{1,2}

Neste trabalho, realizou-se a reação de condensação aldólica do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (piperonal) e acetofenonas substituídas, ou não, para a obtenção das correspondentes chalconas **3a-h**. Posteriormente, realizou-se a redução das chalconas **3a-h** com o borohidreto de sódio (NaBH₄) como agente redutor para a obtenção dos alcoóis racêmicos **4a-h**. (Esquema 1)



Esq. 1.

Resultados e Discussão

Numa primeira etapa, realizou-se a síntese dos compostos **3a-h**, segundo a metodologia descrita na literatura.³ Utilizaram-se quantidades equimolares do piperonal e das acetofenonas substituídas, com etanol como solvente e NaOH 50% (m/v) como catalisador. Os compostos foram caracterizados por ponto de fusão e técnicas espectroscópicas de IV e RMN-¹H em CDCl₃ (400MHz) (Tabela 1).

Como mostrado na Tabela 1 todas as chalconas foram obtidas com bons rendimentos (83,0-94,5%). As análises de RMN-¹H apresentaram picos característicos dos hidrogênios da C=C de chalconas tais como os dubletes com constantes de acoplamento (J=15,6Hz). As análises de IV apresentaram bandas em ~1665 cm⁻¹, referentes as vibrações de deformação axial da ligação carbono oxigênio da carbonila conjugada a C=C.

Tabela 1: Dados analíticos e espectroscópicos das chalconas derivadas do piperonal, via catálise básica.^(a)

3	Rendimento (%)	IV (cm ⁻¹) (C=O); (-C=C-)	RMN- ¹ H (ppm) (-C=C-), J=15,6Hz; d/d ^(d)	pf (pt ^(b)) (°C)
a	94,5	1662,1505	7,74; 7,38	118(118)
b	92,4	1658,1505	7,74; 7,44	143(143)
c	87,4	1658,1501	7,73; 7,38	128(130)
d	83,2	1658,1508	7,72; 7,33	171(176)
e	93,7	1658,1505	7,70; 7,26	95(n.c.)
f	88,5	1666,1501	7,66; 7,23	135(135)
g	84,2	1658,1508	7,52; 7,06	205(206)
h	87,0	1666,1508	7,80; 7,34	146(n.c.)

(a) 2 - 4 h, t.a., agitação magnética; (b) literatura; n.c. = não consta; (d) duplo-dublete

A seguir, realizou-se a redução dos compostos **3a-h** com NaBH₄ para obtenção dos alcoóis racêmicos **4a-h**. A reação foi feita conforme a metodologia descrita na literatura.³ Os compostos foram caracterizados utilizando os mesmos métodos que as chalconas, além de medidas de rotação ótica ([α]_D).

Os alcoóis racêmicos foram obtidos com bons rendimentos, sendo de 87,0-92,4%. Os espectros de RMN-¹H apresentaram sinais característicos da formação dos alcoóis, tais como, um dublete em ~6,52ppm (J=15,6Hz), um duplo dublete em ~6,2ppm (J=15,6 e 6,8 Hz) e um dublete em ~4,27ppm. Nos espectros de IV, foram observadas bandas em aproximadamente 3417 (ν OH) e 1607 cm⁻¹ (ν C=C). As análises de RMN-¹H aliadas às de IV, comprovam a formação dos alcoóis. Para verificar a pureza enantiomérica destes, realizaram-se estudos de polarimetria, e todos os alcoóis apresentaram [α]_D=0, evidenciando a formação de mistura racêmica.

Conclusões

O método de condensação aldólica via catálise básica, bem como o de redução com NaBH₄, mostrou-se eficiente para obtenção das chalconas e dos alcoóis. Os alcoóis racêmicos obtidos neste trabalho serão utilizados como padrões em reações biocatalisadas por fermento de pão.

Agradecimentos

UFSC, CNPq, CAPES.

¹Lahtchev, K. L.; Batovyska, D. I.; Parushev, St. P.; Ubiyovkov, V. M.; Sibirny, A. A., *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, doi:10.1016/j.ejmech.2007.12.027

²Petrov, O.; Ivanova, Y.; Gerova, M., *Catal. Commun.*, **2008**, 9, 315-316.

³Costa, P.; Pili, R.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M., *Substâncias Carboniladas e Derivados*, Porto Alegre:Brookman, 354-355, 2003.

(I)

(QO)

XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQsul)

Influência da temperatura e solvente na bio-hidrogenação da 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona com fermento de pão em sistema bifásico

Flávia Luiza de S. Mundstock* (IC)¹, Vanessa D. Silva (PG)¹ e Maria da Graça Nascimento (PQ)¹

Tel./Fax: +55-48-37219968; *mundstock@gmc.ufsc.br

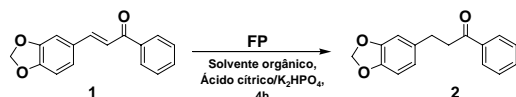
¹Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Química – Florianópolis, SC – 88040-900.

Palavras Chave: bio-hidrogenação, sistema bifásico, fermento de pão.

Introdução

A reação de bio-hidrogenação mediada por leveduras de *S. cerevisiae* (fermento de pão, FP) de compostos carbonílicos α,β -insaturados, tais como as chalconas, pode resultar na redução completa do sistema carbonílico α,β -insaturado com a formação do álcool saturado, redução exclusiva da carbonila ou hidrogenação exclusiva da ligação dupla carbono-carbono com formação do aldeído ou cetona saturada.^{1,2}

Neste trabalho, foi verificado o efeito da temperatura e do solvente orgânico nas reações de bio-hidrogenação do 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona (**1**) mediadas por fermento de pão comercial (FP). Foi avaliada a influência de solventes orgânicos com diferentes polaridades em sistema bifásico tamponado a pH 4,5. **Equação 1**



Eq. 1

Resultados e Discussão

Realizou-se o estudo da influência da variação da temperatura na reação de bio-hidrogenação de **1** (1mmol, 252mg), mediada por FP (6g) em sistema bifásico formado por 30 mL de *n*-hexano e 30 mL de solução tampão ácido cítrico/K₂HPO₄, pH 4,5. As reações foram realizadas a 25, 30, 35, 40, 45, 50°C por 4h. As conversões em 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propanona (**2**), foram determinadas por RMN ¹H (400MHz), e estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Efeito da temperatura na reação de bio-hidrogenação de **1** mediada por FP.^(a)

Temperatura (°C)	Conversão ^(b) (%)
25	59
30	65
35	67
40	68
45	63
50	58

(a) 6g de FP, 1mmol de substrato, 30 mL de *n*-hexano, 30 mL de tampão pH 4,5, 4 h; (b) determinada por RMN ¹H.

As maiores conversões em **2** foram obtidas a 35 e 40°C, sendo de 67 e 68%. Nas outras temperaturas, as conversões foram menores, sendo de 58-59%. A partir destes resultados, utilizou-se 35°C nos estudos subsequentes.

A seguir, foi avaliada a influência dos solventes orgânicos heptano (log P 4,00); hexano (log P 3,50); tetracloreto de carbono (log P 3,00); tolueno (log P 2,50); *n*-butanol (log P 0,80); e acetonitrila (log P -0,33) na bio-hidrogenação de **1**, em sistema bifásico. Os resultados obtidos para as conversões em **2** estão apresentados na **Tabela 2**

Tabela 2- Conversões em **2** com solventes orgânicos de diferentes polaridades.^(a)

Solvente	Log P ³	Conversão ^(b) (%)
heptano	4,00	67
hexano	3,50	67
CCl ₄	3,00	38
tolueno	2,50	33
<i>n</i> -butanol	0,80	> 0
acetonitrila	-0,33	> 0

(a) 6g de FP, 1mmol de substrato, 30 mL de solvente orgânico, 30 mL de solução tampão pH 4,5, 35°C, 4 h; (b) determinada por RMN ¹H.

Ao utilizar os solventes com log P>2,5, as conversões em **2** foram de 33-67%, e com os solventes mais polares (log P<0,8) não foi observado a formação do produto. Estes dados são concordantes com a literatura que reporta que solventes apolares são mais efetivos em reações biocatalisadas.^{2,3}

Conclusões

O FP foi um biocatalisador bastante eficiente nas reações de bio-hidrogenação de **1**, reduzindo seletivamente a ligação dupla C=C. Esta reação foi dependente da temperatura e do solvente orgânico usado no sistema bifásico.

Agradecimentos

UFSC, CNPq e CAPES.

¹ Zagolda, M., Pleniewicz, J., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 1958-1962.

² Muller, A., Hauer, B., Rosche, B., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, 38, 126-130.

³ Lanne, C., Boeren, S., Vos, H., et al. *Biotechnol. Bioeng.*, **1987**, 30, 81-87.